



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOLÓGICA
DE FOSFOLIPASES ÁCIDAS DA PEÇONHA DE CASCAVEL
(*Crotalus durissus cascavella*)

ANA RAFAELA MOTA GONZAGA

Recife/PE

2017

ANA RAFAELA MOTA GONZAGA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOLÓGICA
DE FOSFOLIPASES ÁCIDAS DA PEÇONHA DE CASCAVEL
(*Crotalus durissus cascavella*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Departamento de Zoologia, Centro Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Prof.^a Dra. Míriam Camargo Guarniei Ogata

Coorientador: Dr. Rodrigo da Silva Ferreira

Recife/PE
2017

Catalogação na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Gonzaga, Ana Rafaela Mota

Isolamento e caracterização estrutural e biológica de fosfolipases ácidas da peçonha de cascavel (*Crotalus durissus cascavella*) / Ana Rafaela Mota Gonzaga. – Recife: O Autor, 2017.

69 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Míriam Camargo Guarnieri Ogata

Coorientador: Rodrigo da Silva Ferreira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Animal, 2017.

Inclui referências

1. Cobra venenosa- veneno 2. Fosfolipase A2 3. Trombina I. Ogata, Míriam Camargo Guarnieri (orient.) II. Ferreira, Rodrigo da Silva (coorient.) III. Título.

615.942

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-286

ANA RAFAELA MOTA GONZAGA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOLÓGICA DE
FOSFOLIPASES ÁCIDAS DA PEÇONHA DE CASCAVEL (*Crotalus durissus*
cascavella)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Animal, da
Universidade Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para a obtenção do grau
de Mestre em Biologia Animal.

Data de aprovação: 20/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. Míriam Camargo Guarnieri Ogata
Universidade Federal de Pernambuco (Presidente)

Prof.^a Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Titular
Departamento de Zoologia

Prof.^a Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE/CAV) – Titular
Departamento de Fisiologia/Farmacologia

Prof.^a Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Titular
Departamento de Bioquímica

Prof.^a Dra. Bruna Martins Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Suplente
Departamento de Zoologia

Prof.^a Dra. Erika Maria Silva Freitas
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE/CAV) – Suplente
Núcleo de Biologia

Recife/PE
2017

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pela oportunidade de vivenciar toda essa experiência, e por cuidar de mim nos mínimos detalhes.

Agradeço a Professora Míriam, que sempre foi muito mais do que uma professora e orientadora pra mim, a senhora sempre foi um exemplo de ser humano, uma mãe, amiga, companheira! Muito obrigada por todo o carinho e cuidado desde o dia que resolvi entrar para a família LAPTx.

Ao meu Coorientador Rodrigo, por ter aceitado participar desse desafio junto comigo! Obrigada pela ajuda.

Agradeço imensamente à minha mãe Ana Paula, por sempre ter apoiado todas as minhas escolhas, por ter me incentivado a ir pra São Paulo, por todo dia ter cuidado de mim mesmo de longe, sempre orgulhosa! Obrigada pelo apoio. Ao meu pai de coração Alberino (Bê), por sempre enxergar em mim a melhor estudante/profissional, e por ter cuidado da minha mãe enquanto estive longe. Conseguí chegar aqui por vocês. Amo os dois!

A minha família, pela vibração de cada conquista e pela curiosidade do meu trabalho com as serpentes. Em especial a minha madrinha Ana Claudia, pelas visitas em São Paulo me fazendo matar a saudade de casa.

Obrigada ao meu pai João e Verônica, pelo carinho e por sempre tentar entender a “bioquímica”.

Ao meu noivo, Rômulo, que durante todo este tempo sempre me apoiou, me incentivou, comemorou minhas vitórias e não me deixou ficar triste quando algo deu errado! Obrigada pela paciência, carinho, amor e cuidado! Obrigada por estudar comigo e se animar com as fosfolipases!! Parte desse trabalho também é seu. Te amo muito!

Aos meus sogros, Léa e Rômulo, e cunhados, Rodrigo e Thaís, por se tornarem minha segunda família, por tentarem me ajudar sempre quando eu tinha dúvidas e por cederem espaço em sua casa quando a minha ficava “pequena”.

Aos meus queridos amigos do LAPTx, Chi, Nica, Anninha, Mika, Will, Camila, Jean, Ana Paula, Thais, Tiago e Paulo pelos dias, meses e anos de convivência! Em especial a Ikaro e Arthur, por me aguentarem chorar, por me fazerem rir, estarem sempre ao meu lado. Quero os dois sempre pertinho de mim! A Mari e Érica que compartilharam dos meus dias em São Paulo. A chegada de vocês tornou tudo mais leve! Obrigada pelas conversas, passeios, comprinhas, alegrias e tristezas! Meus dias com vocês eram sempre mais alegres. Mari, obrigada por sempre me fazer rir, você é uma menina iluminada e muito dedicada. Nunca desista dos seus sonhos!

Aos companheiros de pós-graduação, Larissa e Rafael, pela convivência e parceria nas aulas, trabalhos e seminários realizados ao longo desses dois anos.

Obrigada a Celso, por me acolher em sua casa, pelo afeto, conversas, pelas comemorações de bons resultados, por todos os “boa noite” desejados e conselhos dados. Serei eternamente grata. Ganhei mais um pai!

A Carol e Camila, pelo amor, carinho, diversão, saídas, lanchinhos, risadas, por se preocuparem e cuidarem de mim como se eu fosse membro da família. Vocês são especiais demais!

A Rô, Marcelo, Gabi, Dona Vera e Dani, por terem me recebido e me acolhido como parte da família!

Obrigada aos meus amigos da faculdade, por me acompanharem nesse longo caminho acadêmico!

Agradeço a Professora Maria Luiza, pela confiança, oportunidade e entusiasmo com o meu trabalho. A todos do Laboratorio de Bioquímica da Unifesp, em especial a Luciana, Mariana, Tatiana, Joana, André, Luiza e Ricardo, pelos descontraídos dias de trabalho, pelo cuidado, amor, atenção, ajuda, risadas e profissionalismo! Vocês foram parte essencial desta jornada!

Agradeço em especial à amiga Raiana, pois quando a saudade de casa apertava eu tinha sempre aquele sotaque gostoso e tão familiar por perto. Obrigada por suas palavras de apoio e incentivo, por todo o seu carinho, compreensão e cuidado comigo!

Obrigada a Professora Cláine, pela disponibilidade em discutir resultados, pelas correções e observações sempre pertinentes. Obrigada por me acompanhar e ajudar desde a graduação.

Agradeço aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e participarem deste projeto.

A CAPES, pelo financiamento deste projeto.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Crotalus durissus cascavella é uma subespécie endêmica da região Nordeste do Brasil, cuja peçonha difere das demais subespécies do país pela ausência de crotamina e alta concentração de fosfolipases A₂ (PLA₂) ácidas. Neste estudo, duas novas PLA₂s ácidas, denominadas Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂, foram purificadas da peçonha de *C. d. cascavella* através de duas e três etapas cromatográficas, respectivamente. A pureza e homogeneidade de ambas fosfolipases foram determinadas por SDS-PAGE e espectrometria de massa, apresentando uma banda única e massa de 14.247 Da (Cdca-I-PLA₂) e 14.418 Da (Cdca-II-PLA₂). Ambas fosfolipases foram ativas sobre 4-nitro-3-ácido octanoil benzóico, apresentando atividade específica de $11,51 \pm 0,50$ U/mg e $26,75 \pm 0,15$ U/mg, $K_m = 0,2280$ mM e $0,3993$ mM e $V_{max} = 13,15 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ e $39,68 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivamente. Ambas não apresentaram atividade sobre BApNA. A Cdca-I-PLA₂ apresentou atividade hemaglutinante na dose de $15 \mu\text{M}$, enquanto a Cdca-II-PLA₂ apresentou atividade sobre substrato fluorogênico de trombina nas doses de $15 \mu\text{M}$ e $30 \mu\text{M}$. As Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂ reduziram a agregação plaquetária induzida por colágeno, adrenalina e ácido araquidônico, porém as duas enzimas ($20 \mu\text{M}$) não reduziram a agregação quando ADP foi utilizado como agonista. Cdca-I-PLA₂ apresentou atividade dose resposta como agonista de agregação em plaquetas lavadas e reduziu significativamente a atividade agregante plaquetária da trombina. Cdca-I-PLA₂ apresentou maior atividade anticoagulante, prolongando os tempos de protrombina (TP; $30 \mu\text{M}$; R = 22) e tromoplastina parcial ativada (TTPa; $30 \mu\text{M}$; R = 10), porém não promoveu alteração do tempo de trombina (TT) na dose de $10 \mu\text{M}$. Cdca-II-PLA₂ prolongou discretamente o TP ($30 \mu\text{M}$; R = 2) e TTPa ($30 \mu\text{M}$; R = 1,5) e significativamente o TT ($20 \mu\text{M}$; R = 7). Desta forma, nossos resultados sugerem que a Cdca-I-PLA₂ é uma quimerolectina anticoagulante com importante atividade sobre agregação plaquetária, enquanto Cdca-II-PLA₂ possui alta atividade enzimática, inibe tanto a agregação plaquetária quanto a coagulação, agindo como inibidor de trombina por meio da sua ligação com o fibrinogênio.

Palavras chave: Fosfolipases A₂. Anti-agregante plaquetária. Anti-coagulante. Inibidor de trombina.

ABSTRACT

Crotalus durissus cascavella is an endemic subspecies from Northeast region of Brazil, whose venom differs from the other subspecies of the country due to the absence of crotamine and high concentration of acidic phospholipase A₂ (PLA₂). In this study, two new acidic PLA₂s, named Cdca-I-PLA₂ and Cdca-II-PLA₂, were purified from *C. d. cascavella* venom by two and three chromatographic steps, respectively. The purity and homogeneity of both phospholipases were determined by SDS-PAGE and mass spectrometry, showing a single band and molecular mass of 14.247 Da (Cdca-I-PLA₂) and 14.418 Da (Cdca-II-PLA₂). Both PLA₂s were active on 4-Nitro-3-(octanoyloxy) benzoic, presenting specific activity of $11,51 \pm 0,50$ U/mg and $26,75 \pm 0,15$ U/mg, $K_m = 0,2280$ mM and $0,3993$ mM and $V_{max} = 13,15 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ and $39,68 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectively. Both had no activity on BApNA. The Cdca-I-PLA₂ showed hemagglutinating activity at the dose of $15 \mu\text{M}$, while Cdca-II-PLA₂ showed activity on fluorogenic thrombin substrate at the doses of $15 \mu\text{M}$ e $30 \mu\text{M}$. The Cdca-I-PLA₂ and Cdca-II-PLA₂ reduced platelet aggregation induced by collagen, adrenaline and arachidonic acid, but the two enzymes ($20 \mu\text{M}$) did not reduce aggregation when ADP was used as an agonist. Cdca-I-PLA₂ showed dose response activity as agonist of aggregation in washed platelets and significantly reduced thrombin platelet aggregation activity. Cdca-I-PLA₂ presented higher anticoagulant activity, prolonging prothrombin time (PT; $30 \mu\text{M}$; R = 22) and activated partial thromboplastin time (aPTT; $30 \mu\text{M}$; R = 10), but did not promote a change in thrombin time (TT) at a dose of $10 \mu\text{M}$. Cdca-II-PLA₂ prolonged discreetly the PT ($30 \mu\text{M}$; R = 2) and the aPTT ($30 \mu\text{M}$; R = 1.5) and significantly prolonged the TT ($20 \mu\text{M}$; R = 7). Thus, our results suggest that Cdca-I-PLA₂ is an anticoagulant chimerolectin with important activity on platelet aggregation, while Cdca-II-PLA₂ has high enzymatic activity, inhibit both platelet aggregation and coagulation, acting as thrombin inhibitor through its binding to fibrinogen.

Key words: Phospholipases A₂. Antiplatelet. Anticoagulant. Thrombin inhibitor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição das supespécies de <i>Crotalus durissus</i> no Brasil.....	2
Figura 2. <i>Crotalus durissus cascavella</i>	3
Figura 3. Componentes encontrados na peçonha de serpentes.....	4
Figura 4. Sítio de hidrólise das fosfolipases.....	9
Figura 5. Fases e fatores da agregação plaquetária.....	14
Figura 6. Novo modelo de coagulação sanguínea baseado em superfícies celulares, demonstrando as fases de iniciação, amplificação e propagação.....	15
Figura 7. Fatores plasmáticos envolvidos nas vias da coagulação e seus métodos de avaliação.....	17
Figura 8. Fosfolipases A ₂ da peçonha de serpentes que interferem na coagulação.....	19
Figura 9. Purificação da Cdca-I-PLA ₂	29
Figura 10. Purificação da Cdca-II-PLA ₂	30
Figura 11. Efeito do pH e temperatura na atividade fosfolipásica.....	31
Figura 12. Cinética enzimática determinada de Cdca-I-PLA ₂ e Cdca-II-PLA ₂	32
Figura 13. Alinhamento múltiplo da sequência da Cdca-I-PLA ₂ (Número de acesso: 199376) e outras fosfolipases de peçonha de serpentes.....	33
Figura 14. Alinhamento múltiplo da sequência da Cdca-II-PLA ₂ (Número de acesso: 6480) e outras fosfolipases de peçonha de serpentes.....	34
Figura 15. Atividade tipo trombina das fosfolipases.....	35
Figura 16. Efeito da Cdca-I-PLA ₂ na agregação plaquetária em PRP.....	37
Figura 17. Efeito da Cdca-II-PLA ₂ na agregação plaquetária em PRP.....	38
Figura 18. Efeito da Cdca-I-PLA ₂ e Cdca-II-PLA ₂ na agregação de plaquetas lavadas.....	39
Figura 19. Efeito das fosfolipases na agregação de plaquetas lavadas na presença e ausência de trombina.....	40
Figura 20. Efeito das fosfolipases na coagulação.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Superfamília das fosfolipases A ₂	10
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3FTx: 3-finger toxins

ADP: adenosina difosfato

Ad-PLA₂: fosfolipases A₂ adiposas

BApNA: N-benzoil-DL-arginina pnitroanilida

CO₂: dióxido de carbono

COLSAN: Associação Beneficente de Coleta de sangue

c-PLA₂: fosfolipases A₂ citosólicas

CRISP: proteínas ricas em cisteína

Da: Dalton

FT: fator tecidual

FvW: fator von Willebrand

GpIb/IX/V: Glicoproteína Ib/IX/V

GpIIb/IIIa: integrina $\alpha IIb\beta 3$

GpVI: Glicoproteína VI

IC₅₀: 50% da concentração inibitória máxima

i-PLA₂: fosfolipases A₂ independentes de cálcio

kDa: quilodalton

Km: constarnte de Michaelis-Menten

Lp-PLA₂: fosfolipases A₂ lisossomais

MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight

NOB: substrato ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico

PAF-AH: fator de ativação plaquetária acetil-hidrolase

PBA: acetato/fosfato/borato

pI: ponto isoelétrico

PIII-SVMP: metaloproteases da classe PIII

PLA₁: fosfolipase A₁

PLA₂: fosfolipase A₂

PLB: fosfolipase B

PLC: fosfolipase C

PLD: fosfolipase D

PPP: plasma pobre em plaquetas

PRP: plasma rico em plaquetas

SDS-PAGE: eletroforese em gel poliacrilamida

s-PLA₂: fosfolipases A₂ secretórias

svVEGF: fator de crescimento endotelial vascular

TFA: ácido trifluoroacético

TP: tempo de protrombina

TT: tempo de trombina

TTPa: tromboplastina parcial ativado

V_{max} : velocidade máxima

Vo: velocidade inicial da reação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 CASCAVÉIS	15
1.1.1 <i>Crotalus durissus</i>	16
1.1 .COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA DE CASCAVÉIS	18
1.2 .FOSFOLIPASES A ₂	22
1.3 .HEMOSTASIA.....	26
1.4.1 Ação das PLA₂s na hemostasia	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL.....	34
2.2 .OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOLÓGICA DE FOSFOLIPASES ÁCIDAS DA PEÇONHA DE CASCAVEL (<i>Crotalus durissus cascavella</i>).....	35
3.1 INTRODUÇÃO	36
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.2.1 Peçonha e reagentes	38
3.2.2 Purificação.....	38
3.2.2.1 Cdca-I-PLA ₂ e Cdca-II-PLA ₂	38
3.2.3 Caracterização Bioquímica	39
3.2.3.1 Determinação da atividade específica	39
3.2.3.2 Efeito da temperatura e pH na atividade fosfolipásica	39
3.2.3.3 Determinação da cinética enzimática	40
3.2.3.4 Determinação do conteúdo de carboidratos.....	40
3.2.3.5 Determinação da sequência de aminoácidos	40

3.2.4 Caracterização Biológica	41
3.2.4.1 Atividade proteolítica	41
3.2.4.2 Determinação da atividade hemaglutinante (AH)	41
3.2.4.3 Atividade sobre plaquetas.....	42
3.2.4.4 Atividade coagulante	42
3.2.4.4.1 <i>Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)</i>	42
3.2.4.4.2 <i>Tempo de protrombina (TP)</i>	43
3.2.4.4.3 <i>Tempo de Trombina (TT)</i>	43
3.2 RESULTADOS	44
3.3.1 Purificação.....	44
3.3.1.1 Cdca-I-PLA ₂	44
3.3.1.2 Cdca-II-PLA ₂	44
3.3.2 Caracterização Bioquímica	47
3.3.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade fosfolipásica.....	47
3.3.2.2 Determinação da cinética enzimática	48
3.3.2.3 Determinação do conteúdo de carboidratos.....	48
3.3.2.4 Determinação de sequência de aminoácidos	48
3.3.3 Caracterização Biológica	51
3.3.3.1 Atividade proteolítica	51
3.3.3.2 Determinação da atividade hemaglutinante (AH)	51
3.3.3.3 Atividade sobre plaquetas.....	51
3.3.3.4 Atividade coagulante	57
3.4 DISCUSSÃO	59
3.5 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CASCAVÉIS

As cascavéis são serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalinae, encontradas na Ásia e nas Américas (CALVETE et al., 2009; PYRON et al., 2013). São representadas pelos gêneros *Crotalus* (LINNAEUS, 1758) e *Sistrurus* (GARMAN, 1884), que divergiram do seu ancestral comum com o gênero *Agkistrodon*, formando um clado monofilético (WÜSTER et al., 2005). O nome cascavel tem origem grega e significa “castanhola”, isso devido ao fato de que, com exceção de algumas espécies que vivem em ilhas e perderam esta característica, todas as espécies de cascavel possuem um guizo na ponta da cauda (CALVETE et al., 2009).

Existem aproximadamente 32 espécies e 66 subespécies de cascavéis no mundo (ITIS, 2017), sendo popularmente conhecidas no Brasil por cascavel, maracambóia maracá e boicininga (PINHO & PEREIRA, 2001). Esses animais habitam áreas abertas, áridas, rochosas e de baixa vegetação, sendo raramente encontrados em florestas ou na faixa litorânea (SOERENSEN, 1990; LIRA-DA-SILVA et al., 2009). São animais carnívoros, assim como todas as demais serpentes (POUGH et al., 2013), alimentando-se principalmente de lagartos, aves e pequenos mamíferos (VANZOLINI et al., 1980; McCURANIE, J.R 1993).

Assim como os demais viperídeos, as cascavéis possuem fossetas loreais, que são órgãos termosensíveis, localizados em cada lado da cabeça na mandíbula superior, entre o olho e a narina. Este órgão de percepção de infravermelho é utilizado para detectar a direção e distância das presas, através da liberação de calor de seus corpos (BULLOCK & COWLES, 1952; BAKKEN & KROCHMAL, 2007).

Esses animais chegaram às Américas durante o fim do Oligoceno e início do Mioceno, quando o leste da América do Norte se separou da Eurásia, dando espaço ao oceano Atlântico (CASTOE et al., 2009).

1.1.1 *Crotalus durissus*

No Brasil existe apenas uma espécie de cascavel, *Crotalus durissus*, descrita por Linnaeus em 1758 (BSH, 2014), que se originou de uma população ancestral distribuída no centro norte do México (WÜSTER et al., 2005). Após o surgimento do Istmo do Panamá, a população de cascavéis migrou ao longo da América Central, colonizando progressivamente a América do Sul através do corredor transamazônico (VANZOLINI & HEYER, 1985; WÜSTER et al., 2002; WÜSTER et al., 2005; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). Atualmente, esta espécie ocorre em formações sazonalmente secas desde o México até o norte da Argentina, mas não são encontradas nas florestas tropicais da América Central e na floresta Amazônica (FILHO et al., 2001; WÜSTER et al., 2005).

No Brasil, *Crotalus durissus* está representada por seis subespécies: *C. d. terrificus* (região Sul e Sudeste), *C. d. dryinas* (Amapá), *C. d. collilineatus* (zonas secas da região Centro-oeste, Minas Gerais e São Paulo), *C. d. cascavella* (áreas da caatinga do Nordeste), *C. d. ruruima* (região Norte) e *C. d. marajoensis* (ilha de Marajó) (Figura 1) (JORGE & RIBEIRO, 1990; COSTA & BÉRNILS, 2014; LIRA-DA-SILVA et al., 2009).

Figura 1. Distribuição das supespécies de *Crotalus durissus* no Brasil.



Fonte: UETZ et al. (2016).

Esses animais, juntamente com serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Micruurus* são considerados de grande importância médica, devido ao grande número de envenenamentos: 437.365 acidentes ofídicos no Brasil durante o período de 2013 a 2015. Dentre os casos identificados durante este período, as cascavéis foram responsáveis por aproximadamente 9% dos casos. Todavia, apesar de causarem o segundo maior número de acidentes, as cascavéis são as responsáveis por causar o maior número de casos letais, com um índice de letalidade duas vezes maior do que àquele encontrado para as jararacas (DA SILVA et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE/SINAN, 2015).

Devido aos graves efeitos toxicológicos causados pela peçonha desta serpente, ao número de acidentes, e o fato de que *Crotalus durissus cascavella* (Figura 2) é endêmica da região Nordeste, estudar as toxinas que compõem sua peçonha torna-se muito importante.

Figura 2. *Crotalus durissus cascavella*.

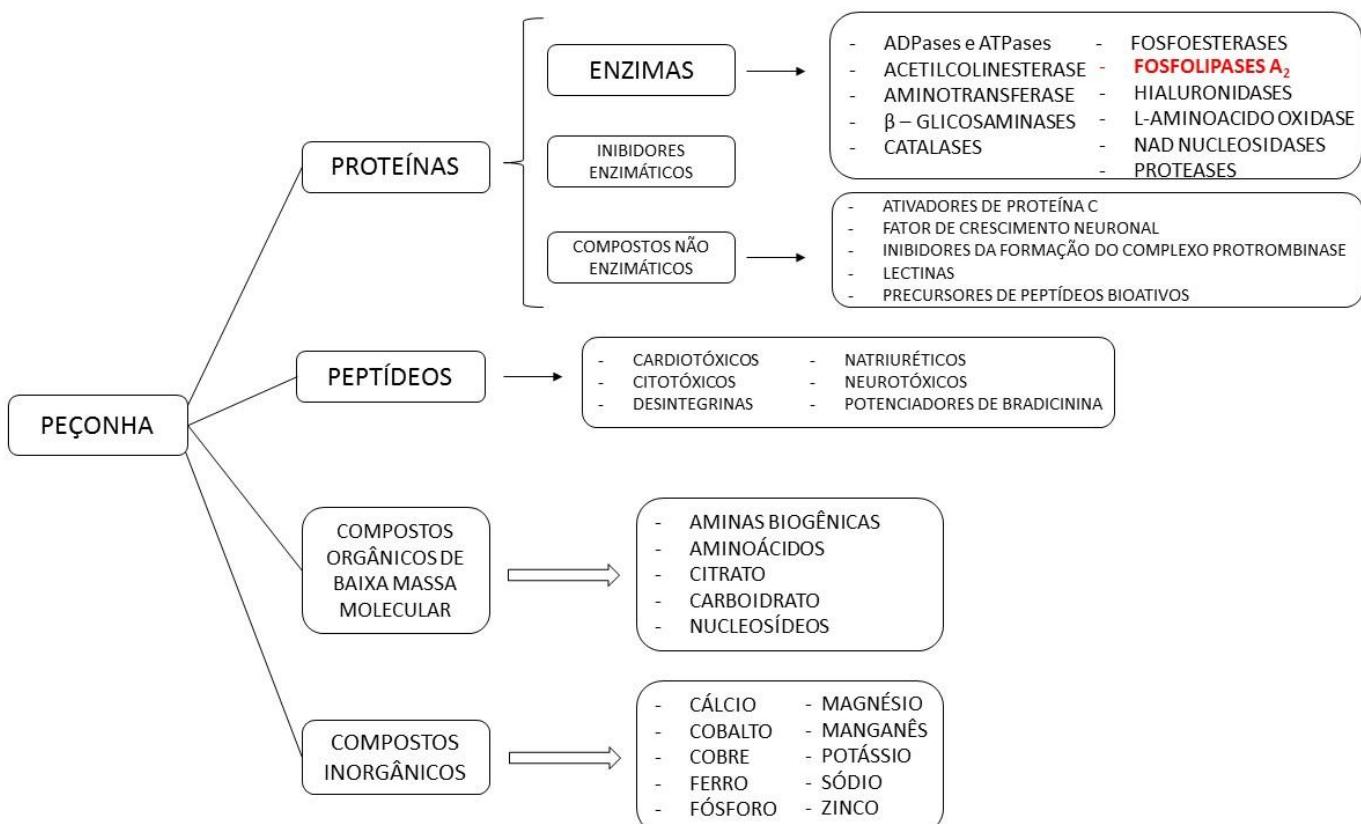


Foto: Miva Filho.

1.1 COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA DE CASCAVÉIS

As peçonhas de serpentes são misturas complexas de substâncias ativas que são designadas para agir em alvos específicos da presa ou vítima (Figura 3) (DA SILVA et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016). A peçonha das cascaveis é constituída por componentes orgânicos e inorgânicos. Dentre os componentes inorgânicos encontram-se o cálcio, ferro, zinco, manganês, potássio e cobre (CALVETE et al., 2007). Os componentes orgânicos consistem em proteínas, na sua maioria, que podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos, além de pequenos peptídeos (CALVETE et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2009).

Figura 3. Componentes encontrados na peçonha de serpentes.



Adaptado de SILVA CUNHA (2010).

Cerca de 90% do peso seco da peçonha das cascaveis é composto por proteínas que são responsáveis por interferir em diversos sistemas fisiológicos da presa (SERRANO et al., 2005; SOUSA et al., 2001). As principais toxinas encontradas na peçonha da serpente *Crotalus durissus* pertencem às famílias: fosfolipases A₂ (fosfolipases monoméricas e

crotoxina), serinoproteases (giroxina), lectinas (convulkxina, crotacetina), metaloproteases da classe PIII (PIII-SVMP) e miotoxinas de baixo peso molecular (crotamina) (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010; CUNHA & MARTINS, 2012; OGUIURA et al., 2005; YONAMINE, 2013; RÁDIS-BAPTISTA et al., 2006; TOYAMA et al., 2006; GEORGIEVA et al., 2010).

A crotoxina é a enzima mais abundante da peçonha de *Crotalus durissus*, e consiste em um complexo heterodimérico formado por uma proteína ácida, não tóxica, denominada crotapotina ou crotoxina A, e uma molécula básica, pouco tóxica e com atividade fosfolipásica denominada crotoxina B (DOS-SANTOS, 2014; BEGHINI et al., 2000). Esta enzima é a principal responsável pelas ações da peçonha das cascavéis encontradas no Brasil. A crotoxina é capaz de induzir danos sistêmicos e seletivos em músculos esqueléticos (SALVINI et al., 2001). Além da ação miotóxica, essa enzima interfere na transmissão neuromuscular através do bloqueio da despolarização induzida por agonistas (BON et al., 1979). Esse bloqueio é realizado pela subunidade básica, a fosfolipase A₂, e sua ação é potencializada pela subunidade ácida, a crotapotina, que previne a ligação inespecífica da PLA₂ com sítios de baixa afinidade (DOS-SANTOS, 2014; BON et al., 1979).

As giroxinas são serinoproteases termolábeis, que tem ação tipo trombina, pois são capazes de converter o fibrinogênio em fibrina (YONAMINE, 2013). Além de sua ação fibrinolítica, essas toxinas são vasodilatadoras e neurotóxicas, e também apresentam uma ação característica, conhecida como rotação tambor, em que camundongos envenenados tem comportamento de fazer rotações no próprio eixo longitudinal (ALVES-DA-SILVA et al., 2011).

Convulkxina e crotacetina são lectinas do tipo C-símile, ou seja, moléculas não enzimáticas, dependentes de Ca²⁺ e que possuem alta afinidade por carboidratos (KINI, 2006; RÁDIS-BAPTISTA et al., 2006; LU et al., 2005). A convulkxina é uma molécula heterodimérica capaz de ativar e agregar plaquetas (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2006). A crotacetina, além de possuir ação pró-agregante plaquetária, também é capaz de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2005).

As L-amino ácido oxidases são flavoenzimas encontradas nos mais diversos organismos vivos, e nas serpentes, são as responsáveis pela cor amarelada característica de algumas peçonhas (SOUZA et al., 2007). Estas enzimas são encontradas em forma de dímeros e possuem ação agregante plaquetária e antibacteriana (TOYAMA et al., 2006).

As toxinas CRISP são proteínas secretórias ricas em cisteínas que também estão presentes na peçonha de *C. d. cascavella* em uma pequena proporção (cerca de 1% das proteínas totais da peçonha) (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

As toxinas conhecidas como PIII-SVMPs são metaloproteases da classe III, ou seja, são hidrolases de alto peso molecular que necessitam de um metal para realizar sua atividade enzimática (CUNHA & MARTINS, 2012) e possuem ação sobre a hemostasia, atuando como fator hemorrágico (COMINETTI et al., 2007). Essas toxinas foram recentemente encontradas na peçonha de *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella* em uma concentração menor do que 1% das proteínas totais (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

As svVEGF, mais conhecidas como fator de crescimento vascular endotelial, são peptídeos que aumentam a permeabilidade dos vasos sanguíneos, e também atuam na estimulação para o surgimento de novos vasos (GEORGIEVA et al., 2010).

As desintegrinas são comumente encontradas na peçonha de serpentes da família Viperidae, e são caracterizadas como peptídeos de baixo peso molecular que se ligam à integrinas (CUNHA & MARTINS, 2012). Estas toxinas são os inibidores de agregação plaquetária mais bem estudados, e representam menos de 1% da peçonha da subespécie *Crotalus durissus cascavella* (KINI, 2011; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

Na peçonha de algumas subespécies de cascavel do Brasil, podem-se encontrar moléculas conhecidas como crotaminas. Essas toxinas são peptídeos pertencentes à família das miotoxinas básicas e apresentam baixo peso molecular (4880 Da), formadas por uma cadeia constituída por 42 resíduos de aminoácidos (CUNHA & MARTINS, 2012; OGUIURA et al, 2005; PEIGNEUR et., 2012). Essas miotoxinas causam mionecrose das fibras musculares, causando paralisia nos músculos através da despolarização do potencial da membrana das células musculares (CUNHA & MARTINS, 2012).

Por fim, as toxinas conhecidas como *3-finger toxins* (3FTx) são neurotoxinas bem caracterizadas da peçonha de serpentes as quais apresentam uma estrutura proteica altamente conservada, as quais consistem em três loops que se assemelham a dedos, que se extendem de um núcleo central compacto (TSETLIN, 1999). Essas toxinas exibem além de neurotoxicidade, efeitos farmacológicos como inibição enzimática, cardiotoxicidade, anticoagulação e citotoxicidade (KINI & DOLEY, 2010).

Ao longo da dispersão e diversificação desses animais da América Central em direção à América do Sul houve uma tendência pedomórfica e um traço adaptativo na composição da peçonha dos mesmos (WÜSTER et al., 2002; CALVETE et al., 2010). As populações de cascavéis encontrada na América do Norte e América Central possuem diferença na composição das toxinas entre adultos e neonatos (CALVETE et al., 2010; LOMONTE et al., 1983). A peçonha dos adultos de cascavéis norte americanas apresenta alta atividade hemorrágica, edematogênica e proteolítica (GUTIÉRREZ et al., 1991; SARAVIA et al., 2002), enquanto a dos filhotes apresenta alta atividade neurotóxica, que está associada basicamente à presença de crotoxina (KINI, 1997). A população da América do Sul apresenta toxinas que causam, principalmente, efeitos neurotóxicos, miotóxicos (atribuído à presença de crotamina) e coagulantes (OGUIURA et al., 2005; AZEVEDO-MARQUES et al., 2003). Mackessy (2008) classificou a peçonha das espécies de *Crotalus* em dois grupos, um pertencente às cascavéis encontradas ao norte do continente e que possuem altos níveis de metaloproteases e baixa toxicidade, e o outro pertencente às encontradas ao sul, incluindo o Brasil, que é altamente tóxica e não apresenta metaloproteases.

Além disso, a espécie *Crotalus durissus* também possui diferença na composição das toxinas de sua peçonha nas diferentes subespécies encontradas no Brasil, de acordo com sua distribuição geográfica (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). Esta diferença está relacionada com uma tendência no aumento das concentrações de crotoxina e crotamina ao longo do eixo norte-sul do país, coincidindo com a rota de dispersão do gênero *Crotalus* no país (CALVETE et al., 2010). As subespécies encontradas mais ao norte, como por exemplo, a subespécie *Crotalus durissus cascavella*, possuem uma maior concentração das fosfolipases ácidas D49, ao mesmo tempo em que há uma diminuição da expressão da crotoxina e crotamina em comparação com as subespécies mais ao sul

(BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). As fosfolipases ácidas D49 podem chegar a representar 18% da composição da peçonha de *Crotalus durissus cascavella*, não sendo observadas nas outras subespécies de cascavéis do Brasil (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

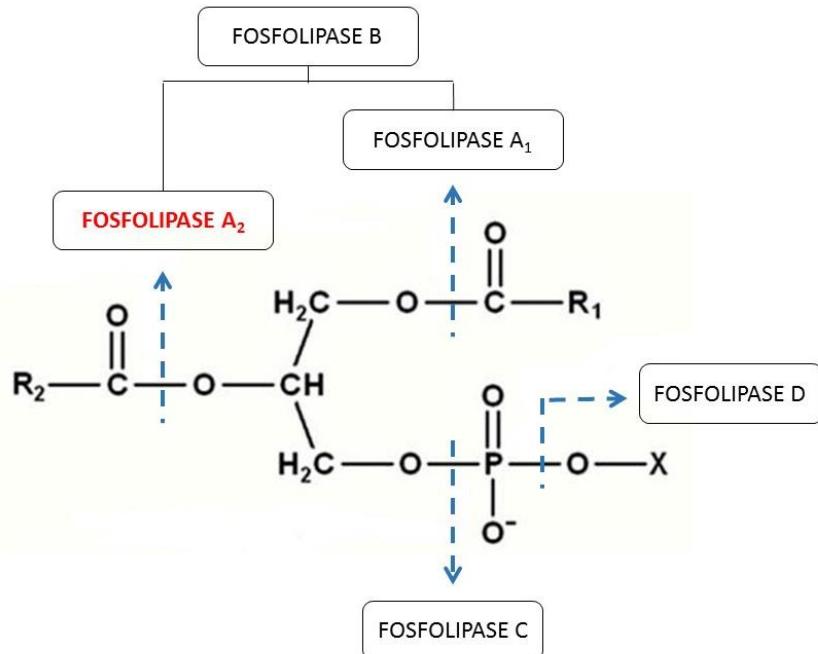
1.2 FOSFOLIPASES A₂

As fosfolipases são enzimas lipolíticas, classificadas de acordo com o sítio de hidrólise, em cinco grupos: PLA₁, PLA₂, PLB, PLC e PLD (Figura 4) (DENNIS, 1994). As PLA₁ são enzimas que catalisam a hidrólise na posição *sn-1* e são encontradas em diferentes organismos e tecidos (GATT, 1968; SHILOAH et al., 1973). As PLA₂s clivam lisofosfolipídeos na posição *sn-2* (KUDO, 2004). As fosfolipases B (PLB), também chamadas de lisofosfolipases, são enzimas capazes de clivar as ligações *sn-1* e *sn-2*, simultaneamente (VAN DEN BOSCH et al., 1968). As fosfolipases C (PLC) são fosfodiesterases com importante ação na sinalização celular em mamíferos (REBECCHI & PENTYALA, 2000; HARDEN & SONDEK, 2006). Por fim, as fosfolipases D (PLD) que hidrolisam glicerofosfolipídeos e também catalisam reações de trasfosfatidilação (ULBRICH-HOFMANN et al., 2005).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas intra e extracelulares amplamente distribuídas na natureza e constituindo secreções pancreáticas, exudatos inflamatórios e peçonhas de artrópodes, abelhas, cnidários e serpentes (Heo et al., 2016; Silveira et al. 2012; VALENTIN & LAMBEAU, 2000). Além de serem responsáveis pelo quadro de envenenamento causado por diversos animais, as PLA₂s representam o principal componente da peçonha de serpentes da família Viperidae (SILVEIRA et al., 2012).

As PLA₂ são enzimas estruturalmente relacionadas, cálcio dependentes, e como já mencionado, catalisam a hidrólise de fosfolipídeos na posição *sn-2*, liberando ácidos graxos biologicamente ativos e lisofosfolipídeos (DENNIS, 1994). Um dos ácidos graxos liberados por essa reação, denominado ácido araquidônico, além de ser conhecido como substrato para a biossíntese de mediadores lipídicos da inflamação (e.g. prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), é o precursor de eicosanoides, os quais podem mediar à resposta inflamatória e induzir edema (DENEGRI et al., 2010).

Figura 4. Sítio de hidrólise das fosfolipases. X: álcool polar como colina, serina, etanolamina, mio-inositol, glicerol e fosfatidilglicerol. R₁ e R₂: cadeias hidrocarbonadas de ácidos graxos. Adaptado de KINI (1997).



Fonte: ARAÚJO (2014).

Nas últimas duas décadas, as fosfolipases receberam diferentes classificações de acordo com suas origens, funções, massa molecular e resíduos catalíticos (ver revisão em DENNIS et al., 2011). A superfamília das fosfolipases pode ser dividida em fosfolipases secretórias (s-PLA₂), citosólicas (c-PLA₂), independentes de cálcio (i-PLA₂), lisossomais (Lp-PLA₂), PAF-AH e adiposa (Ad-PLA₂), as quais distribuem-se em 15 grupos (GI a GXV) e seis subgrupos (A, B, C, D, E, F e suas variáveis) (Tabela 1) (DENNIS et al., 2011).

Tabela 1. Superfamília das fosfolipases A₂.

Tipo	Grupo	Subgrupo	Massa molecular (kDa)	Resíduo catalítico
sPLA ₂	GI	A,B	13-15	
	GII	A,B,C,D,E,F	13-17	
	GIII		15-18	
	GV		14	
	GIX		14	
	GX		14	His/Asp
	GXI	A,B	12-13	
	GXII	A,B	19	
	GXIII		<10	
	GXVI		13-19	
cPLA ₂	GIV	A(α), B(β), C(γ), D(δ), E(ε), F(ζ)	60-114	Ser/Asp
iPLA ₂	GVI	A(β), B(γ), C(δ), D(ε), E(ζ), F(η)	84-90	Ser/Asp
PAF-AH	GVII	A(Lp-PLA2), B(PAF-AH II)	40-45	Ser/His/Asp
	GVIII	A(α ₁), B(α ₂), β	26-40	
LpPLA ₂	GXVI		45	Ser/His/Asp
AdPLA ₂	GXVI		18	His/Cys

Fonte: DENNIS et al. (2011).

Os grupos I e II das PLA₂ secretórias são encontrados na peçonha de serpentes, compreendendo proteínas estáveis, versáteis, relativamente pequenas (~13-17 kDa), dependentes de cálcio e ricas em pontes dissulfeto (SCHALOSKE & DENNIS, 2006). As sPLA₂s do grupo I foram isoladas do pâncreas de mamíferos e da peçonha de serpentes das famílias Hydrophiidae (serpentes marinhas) e Elapidae (corais verdadeiras, najas e mambas), enquanto as sPLA₂ II são encontradas na peçonha de serpentes da família Viperidae (jararacas, surucucus e cascavéis) (SOARES et al., 2003; MARCUSSI et al., 2007). A atividade catalítica dessas enzimas sobre membranas celulares de tecidos específicos sugere um importante papel na toxicidade da peçonha, constatando assim a multifuncionalidade dessas proteínas e seu grande potencial para aplicações biotecnológicas na área médica, bem como sua excelência como modelos para o estudo de diferentes mecanismos de ação intra ou extracelular (SILVEIRA et al., 2012).

Apesar de compartilharem grande identidade e aparente simplicidade molecular, estas enzimas, de um modo geral, induzem, nas mais diferentes intensidades, uma grande variedade de efeitos farmacológicos: neurotoxicidade (KINI, 2003), citotoxicidade (CASTILLO et al., 2012), formação de edema (KINI, 2006), atividade bactericida (MENSCHIKOWSKI et al., 2006), miotoxicidade (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 2003), convulsão (FULY et al., 2004), hipotensão (KINI, 2003a), inibição ou indução de agregação plaquetária (LOSCALZO, 2001; TEIXEIRA et al., 2011; KINI & EVANS, 1995) e inibição da coagulação (VALENTÍN & LAMBEAU, 2000).

Portanto, as PLA₂s da peçonha dos viperídeos estão classificadas como do tipo secretória, grupo II e subgrupo A (sPLA₂ - IIA) (DENNIS et al., 2011). As enzimas deste subgrupo podem ainda ser separadas em dois subgrupos: as enzimaticamente ativas que possuem um resíduo de aspartato na posição 49 (Asp49 PLA₂, mais comuns) ou uma serina (Ser49); e as que possuem baixa ou nenhuma atividade catalítica por possuírem a substituição desses resíduos na posição 49 por lisina (Lys49), arginina (Arg49), glicina (Gly 49), glutamina (Gln49), alanina (Ala49) ou asparagina (Asn49) (LOMONTE et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012; WEI et al., 2006).

As fosfolipases A₂ da peçonha de serpentes podem exibir pontos isoelétricos (pI) distintos, tanto ácidos, neutros, quanto básicos (VARGAS et al., 2012). Diversas isoformas podem estar presentes na peçonha de uma mesma espécie (SAIKIA et al., 2012).

Curiosamente, todas as PLA₂s ácidas que foram caracterizadas apresentam um resíduo Asp na posição 49 e não induzem efeitos tóxicos significativos quando comparados com às homólogas básicas (FERNANDÉZ et al., 2010; VARGAS et al., 2012). Isto porque etapas adicionais, envolvidas no reconhecimento e interação interfacial com os alvos biológicos, são necessárias para o desenvolvimento da toxicidade dessas enzimas (JIMENEZ-CHARRIS et al., 2016).

Devido a grande concentração das isoformas ácidas na peçonha de determinadas serpentes e ao alto custo energético para expressá-las, alguns autores sugerem três possíveis explicações. A primeira envolve o fato de que algumas PLA₂ ácidas podem atuar sinergisticamente com as PLA₂ básicas, ou até mesmo com outros componentes da

peçonha, como metaloproteases e citotoxinas, potencializando os efeitos toxicológicos destas moléculas (MORA-OBANDO et al., 2014b; BUSTILLO et al., 2014; JIMENEZ-CHARRIS et al., 2016; RESENDE et al., 2017). A segunda inclui as fosfolipases A₂ ácidas como enzimas que atuam na digestão da presa desses animais (FERNANDÉZ et al., 2010). Por último, outros autores defendem a hipótese de que estas isoformas possuem ações tóxicas que ainda não foram exploradas (FERNANDÉZ et al., 2010).

1.3 HEMOSTASIA

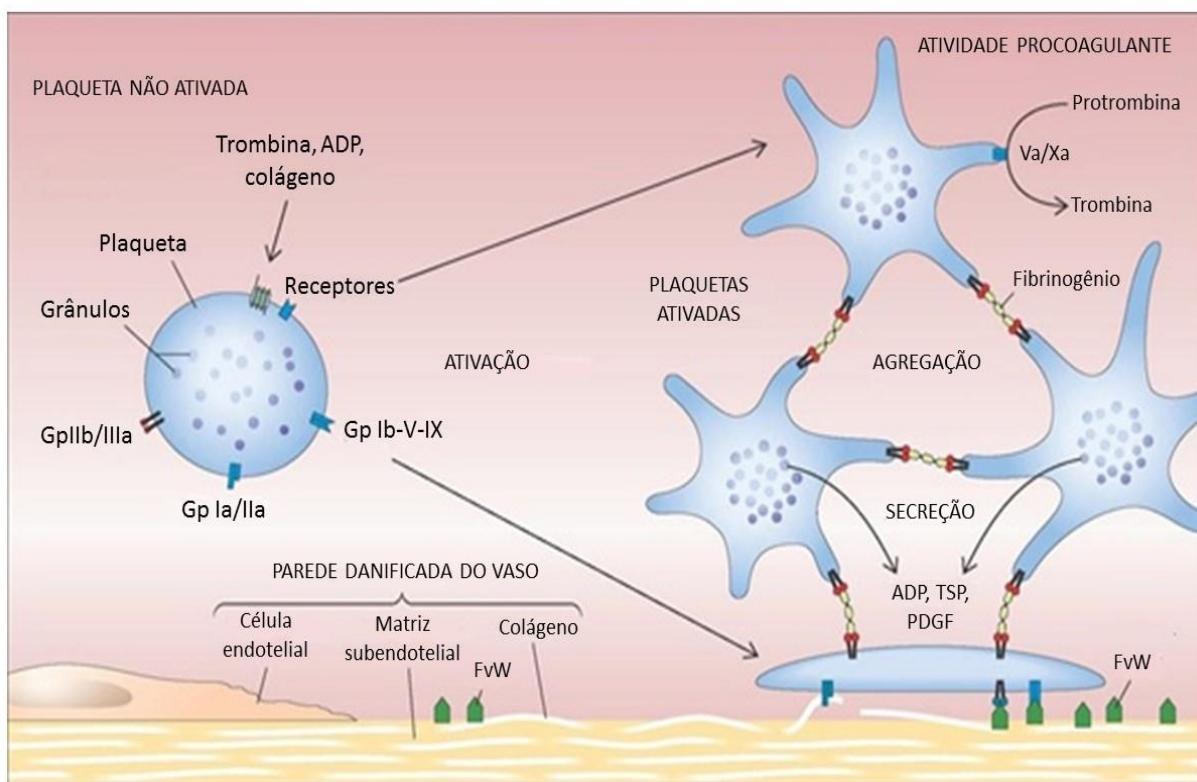
A circulação sanguínea desempenha um papel muito importante na vida dos vertebrados, pois é através dela que ocorre o fornecimento de oxigênio e nutrientes para os tecidos, além da remoção do dióxido de carbono (CO₂) e produtos residuais. Ademais, a circulação é responsável pelo transporte de células imunes e exerce papel vital para a defesa do organismo contra patógenos (KINI, 2011). Este sistema é regulado rigorosamente visando prevenir e sanar injúrias (VERRASTRO, 2006).

Hemostasia é o mecanismo fisiológico responsável por manter o sangue fluido. Este mecanismo evoluiu para reagir à um ferimento, com o objetivo de interromper a perda de sangue por meio do fechamento da lesão na parede do vaso, prevenindo uma hemorragia (BERGER et al., 2014; ERHARDTSEN, 2002). O sistema hemostático envolve diversos fatores (vasculares, plaquetários, coagulantes, anticoagulantes, fibrinolíticos, pressão e fluxo sanguíneo) e três etapas principais: (1) a vasoconstrição, que é o processo de contração dos vasos com objetivo de diminuir seu diâmetro para evitar a perda de sangue; (2) a agregação plaquetária, responsável por formar o primeiro tampão no local da ferida; e (3) a coagulação sanguínea, encarregada de formar o coágulo de fibrina através da ativação de vários fatores do plasma, gerando o coágulo final e interrompendo o sangramento (BERGUER et al., 2014; VERRASTRO, 2006).

A agregação plaquetária se inicia com a lesão ao tecido vascular e consiste em três fases principais (CASTRO et al., 2006). Quando a camada subendotelial de um vaso é lesada os componentes da matriz são expostos, fazendo com que plaquetas sejam recrutadas para o local da ferida. A primeira fase consiste na adesão plaquetária, na qual receptores da membrana da plaqueta, GpIb/IX/V e GpVI se ligam, respectivamente, aos componentes subendoteliais, fator von Willebrand (FvW) e colágeno, fazendo com que

elas fiquem aderidas ao local da lesão (HEEMSKERK et al., 2005; ROBERTS et al., 2004; CASTRO et al., 2006; CLEMETSON, 1997). Além disso, as plaquetas também mudam sua estrutura conformacional, deixando de ser discóides e passando a apresentar pseudópodes (ALLEN et al., 1979; ANDREWS & BERNDT, 2004). Com isto, as plaquetas liberam alguns fatores, como ADP e adrenalina que, juntamente com outros já presentes no plasma como, por exemplo, a trombina, aumentam a adesão e ativação das mesmas, expondo seus receptores e sítios de ligação. Estas plaquetas, agora ativadas, continuam liberando fatores no plasma, ativando novos receptores e recrutando novas plaquetas, as quais se ligam entre si firmemente, caracterizando assim, a segunda fase, a agregação propriamente dita (CASTRO et al., 2006; VERRASTRO, 2006, BRASS, 2010). Na referida fase, o receptor de membrana plaquetária mais abundante, conhecido como integrina $\alpha IIb\beta 3$ (ou GpIIb/IIIa), atrai moléculas de fibrinogênio para, além de serem os responsáveis pela conexão entre as plaquetas, compor o tampão plaquetário em formação, dando-lhe maior consistência (BANNO & GINSBERG, 2008; KASIRER-FRIEDE et al., 2004). A terceira fase, denominada secreção, ocorre quando as plaquetas liberam tromboxana A₂ (formada a partir da lise do ácido araquidônico presente na membrana das plaquetas através da enzima cicloxigenase), bem como ADP e serotonina, fatores pró-agregantes responsáveis pelo recrutamento e agregação de novas plaquetas (VERRASTRO, 2006; CASTRO et al., 2006; FLAUMENHAFT, 2003). Embora separadas para fins didáticos, as três fases da agregação plaquetária ocorrem de maneira concomitante (Figura 5).

Figura 5. Fases e fatores da agregação plaquetária. Após se ligarem aos fatores presentes na matriz subendotelial, as plaquetas mudam sua estrutura discoide, passando a apresentar pseudópodos. O fenômeno de agregação envolve três etapas: adesão (deposição das plaquetas na matriz exposta), agregação (se ligam firmemente umas às outras através do fibrinogênio) e secreção (liberação de moléculas dos grânulos plaquetário). ADP = difosfato de adenosina; Gp = glicoproteína; PDGF = fator de crescimento derivado de plaqueta; TSP = trombospondina; FvW = fator de von Willebrand.

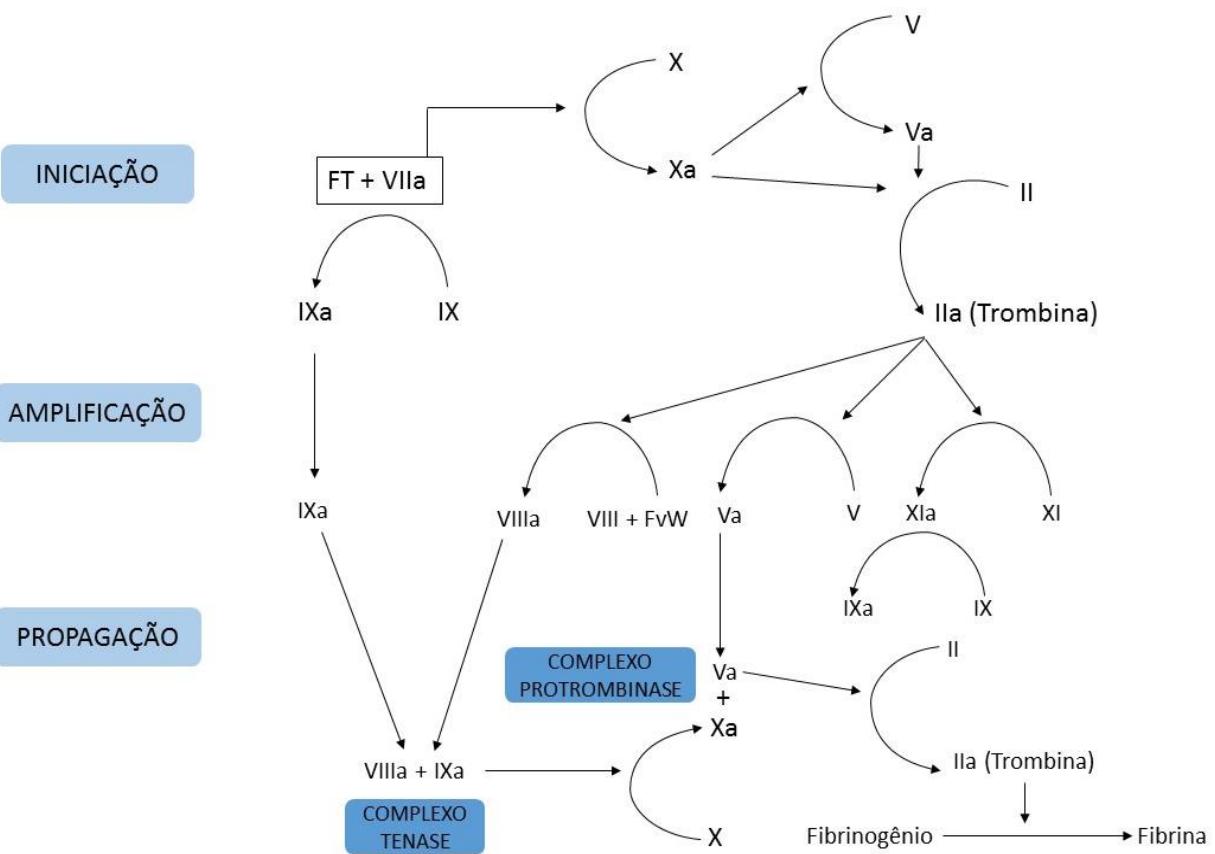


Adaptado de LEUNG (2012).

Paralelamente ao processo de agregação plaquetária, ocorre a coagulação sanguínea, tendo o coágulo de fibrina como produto final. Durante muitos anos o modelo proposto por Macfarlane e Davie & Ratnoff (1946) e conhecido como cascata da coagulação foi utilizado. Nesse modelo ocorre a ativação seriada de zimógenos (enzimas precursoras) em proteases, também conhecidos como fatores de coagulação, resultando na conversão do fibrinogênio (proteína solúvel) em fibrina (polímero insolúvel) pela ação da trombina (FRANCO, 2001).

Atualmente, um novo modelo é reconhecido, baseado em superfícies celulares e, que ao contrário do modelo inicial, onde duas vias (extrínseca e intrínseca) que culminavam em uma via comum, é caracterizado por uma série de estágios ou fases que consideram a interrelação de processos celulares, bioquímicos e físicos. As etapas que descrevem esse novo modelo são: iniciação, amplificação, propagação e finalização (FERREIRA et al., 2010; VINE, 2009) (Figura 6).

Figura 6. Novo modelo de coagulação sanguínea baseado em superfícies celulares, demonstrando as fases de iniciação, amplificação e propagação. Fator tecidual (FT), ativado (a).



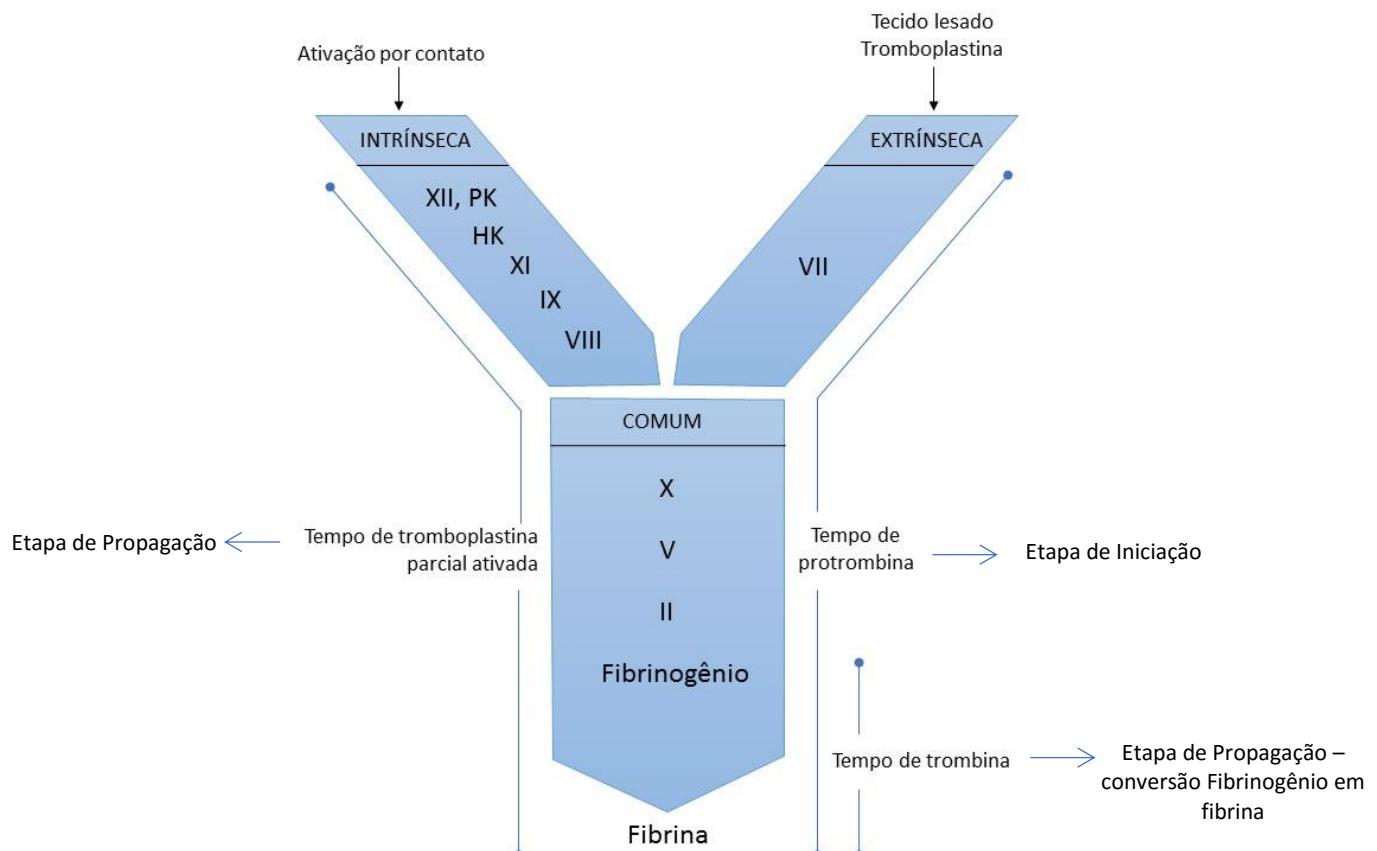
Adaptado de VINE (2009).

A fase da iniciação ocorre nas células que expressam o fator tecidual (FT), onde o mesmo é exposto aos componentes do sangue no local da lesão. O FT interage com FVII, ativando-o e formando o complexo FVIIa/FT, responsável pela ativação de outros fatores (HOFFMAN, 2003; FERREIRA et al., 2010). Na fase da amplificação, pequenas quantidades de trombina, sintetizadas pelas células que expressam FT, interagem com as plaquetas, fazendo com que as mesmas exponham seus receptores e sítios de ligação

(HOFFMAN & MONROE, 2001). Com isso, as plaquetas têm a permeabilidade de sua membrana alterada, resultando na entrada e saída de moléculas que atraem fatores de coagulação (PÉREZ-GÓMEZ & BOVER, 2007). A trombina também ativa os co-fatores FV e FVIII que irão mediar a adesão e agregação plaquetária, além da ativação do FXI na superfície das plaquetas (FERREIRA et al., 2010; HOFFMAN, 2003; VINE, 2009). Durante a etapa da propagação há uma grande síntese de trombina, formação do tampão plaquetário pelo recrutamento de plaquetas e produção dos complexos tenase e protrombinase na superfície dessas plaquetas ativadas (MONROE & HOFFMAN, 2006). Com o complexo protrombinase ativado uma grande quantidade de protrombina é convertida em trombina gerando a quebra do fibrinogênio em fibrina, que resultará no coágulo sobre a área lesada (RIDDEL et al., 2007). Na última etapa, a finalização, ocorre a ativação de anticoagulantes naturais a fim de evitar que o coágulo não obstrua o vaso de forma trombótica (FERREIRA et al., 2010).

O tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), o tempo de protrombina (TP) e o tempo de trombina (TT) são ensaios realizados para analisar diferentes etapas da coagulação (HOFFMAN, 2003; LEUNG, 2012). Esses métodos visam avaliar as vias extrínseca e comum através do TP, intrínseca e comum, por meio do TTPa, e a via comum através do TT. Com o novo modelo de coagulação, o TP passa a avaliar os níveis de fatores procoagulantes que estão envolvidos na etapa da iniciação da coagulação, enquanto o TTPa analisa os níveis de fatores procoagulantes envolvidos na fase de propagação (FERREIRA et al., 2010; MONROE & HOFFMAN, 2006). Por outro lado, o TT avalia as irregularidades na conversão do fibrinogênio em fibrina na fase de propagação (Figura 7) (LEUNG, 2012; JESPERSEN & SIDELMAN, 1982).

Figura 7. Fatores plasmáticos envolvidos nas vias da coagulação e e seus métodos de avaliação. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Trombina (TT).



1.4.1 Ação das PLA₂s na hemostasia

Muitas proteínas presentes na peçonha das serpentes tem ação sobre a hemostasia, visando à imobilização e morte das presas (KINI, 2011). Em razão do papel fundamental que as plaquetas exercem para o equilíbrio deste sistema, as mesmas representam um alvo para as enzimas encontradas nessas peçonhas (SAIKIA et al., 2012; FULY et al., 2004). Tanto a alteração na agregação plaquetária quanto na coagulação sanguínea são efeitos característicos das toxinas presentes na peçonha das serpentes pertencentes à família Viperidae (OSIPOV et al., 2010). Os efeitos farmacológicos que afetam esses sistemas podem ser produzidos por proteínas de diversas famílias, como por exemplo: metaloproteases (FOX & SERRANO, 2005), serinoproteases (SERRANO & MAROUN, 2005), fosfolipases A₂ (KINI, 2005), ADPases, L-amino ácido oxidases (KINI, 2011),

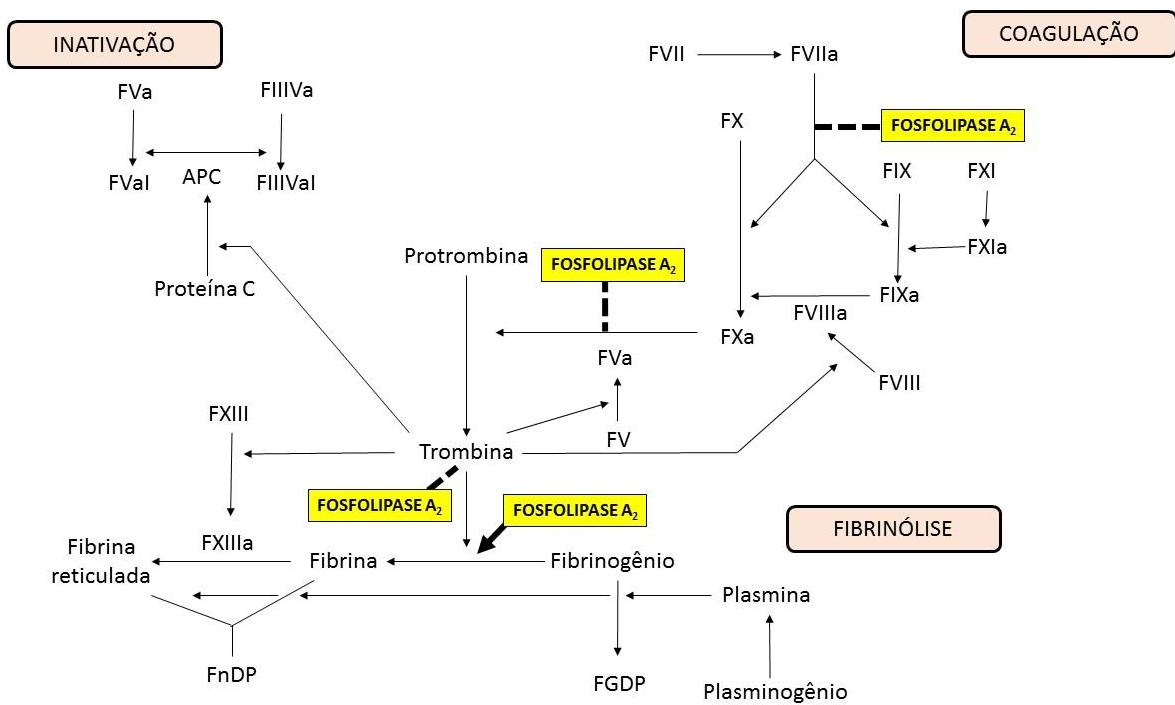
lectinas (MORITA, 2005), desintegrinas (GAN et al., 1988), e toxinas tipo 3 dedos (3FTxs) (KINI & DOLEY, 2010).

As PLA₂s de serpentes foram classificadas em três grupos distintos de acordo com sua atuação na agregação plaquetária. O primeiro grupo inclui as PLA₂s que induzem a agregação, o segundo grupo é formado por PLA₂s que inibem a agregação induzida por diferentes agonistas e o terceiro grupo inclui aquelas PLA₂s que possuem efeito bifásico, ou seja, em certas doses inibem a agregação, e em outras doses são capazes de agrregar plaquetas (ANDREWS & BERNDT, 2000; KINI & EVANS, 1990). Teixeira e colaboradores (2011) sugerem que o efeito dessas enzimas sobre as plaquetas podem ocorrer devido à intervenção direta ao sítio catalítico, através da região C-terminal destas PLA₂.

Além de atuarem na agregação plaquetária, as fosfolipases A₂ tem sido consideradas as principais responsáveis pelos efeitos anticoagulantes de grande parte das peçonhas, atuando em diferentes fases da coagulação (Figura 8) (DENEGRI et al., 2010; KINI, 2005). Estas enzimas podem ser classificadas em três classes em relação ao seu efeito na coagulação: aquelas fortemente anticoagulantes, que inibem a coagulação sanguínea em concentrações da enzima menores do que 2 µg/ml; as fracamente anticoagulantes, que apresentam efeitos entre 3 e 10 µg/ml ; e as que são pró coagulantes (KINI, 2006; BOFFA & BOFFA, 1976). Essa classe de proteínas pode apresentar diversas isoformas que diferem na habilidade de afetar a coagulação, podendo interferir na fase da iniciação (fracamente anticoagulantes) ou em ambas fases, da iniciação e no complexo protrombinase (fortemente anticoagulantes) (KINI, 2005).

Devido a presença de fosfolipídeos na superfície dos complexos da coagulação, diversos pesquisadores acreditaram por muito tempo que o papel das PLA₂ na coagulação envolvia a hidrólise e destruição física desses fosfolipídeos (KINI, 2005; KINI, 2011). Contudo, alguns experimentos sugerem que além da hidrólise, essencial para os efeitos anticoagulantes exibidos por essas enzimas, a ligação dessas enzimas a alguns fatores da coagulação, como por exemplo, fator Xa e trombina podem ser essenciais para essa atividade (KINI, 2006; KINI, 2005; SHARMA et al., 2016).

Figura 8. Fosfolipases A₂ da peçonha de serpentes que interferem na coagulação.
 PLA₂ que interferem através da proteólise de fatores específicos (flecha espessa), outras PLA₂ interferem através de ligação (linha tracejada).



Adaptado de KINI (2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Purificar e caracterizar fofolipases A₂ ácidas da peçonha de *Crotalus durissus cascavella*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar fosfolipases A₂ ácidas da peçonha de *C. d. cascavella*.
2. Caracterizar a estrutura das fosfolipases isoladas.
3. Caracterizar as atividades biológicas das fosfolipases isoladas.

3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E BIOLÓGICA DE FOSFOLIPASES ÁCIDAS DA PEÇONHA DE CASCAVEL (*Crotalus durissus cascavella*)

(Manuscrito a ser submetido para publicação no
periódico Biochemical Pharmacology)

3.1 INTRODUÇÃO

Crotalus durissus (Família Viperidae), única espécie de cascavel encontrada no Brasil (WÜSTER et al., 2005), possui grande importância médica por apresentar a maior letalidade dentre as serpentes peçonhentas do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SINAN, 2013). A espécie subdivide-se em sete subespécies dependendo da região geográfica do país (UETZ & HOŠEK, 2015), que possuem diferenças na composição das toxinas da sua peçonha (CALVETE et al., 2010). A peçonha das cascavéis das espécies *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus* (encontradas na região Sul do país) possui altos níveis de crotoxina e crotamina, mas baixos níveis de fosfolipases A₂ ácidas, 4,6% e 2,1% respectivamente (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). Por outro lado, a peçonha da única subespécie de cascavel localizada no nordeste do Brasil (*C. d. cascavella*) é caracterizada pela ausência de crotamina (SANTORO et al., 1999) e por apresentar alta concentração de fosfolipases A₂ ácidas (18%) (GEORGIEVA et al., 2010; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

Fosfolipases A₂ (PLA₂s; E.C.3.1.1.4) são enzimas que catalisam a hidrólise de glicerofosfolipídeos de membrana na posição *sn*-2, liberando ácido araquidônico, ácidos graxos e lisofosfolipídeos (KINI, 2003; OLIVEIRA et al., 2008; VIJA et al., 2009; ROMERO-VARGAS et al., 2010; MUKHERJEE, 2014; GIMENES et al., 2014). Estas enzimas podem ser classificadas em cinco principais grupos, de acordo com o número de pontes dissulfeto, massa molecular e sequência de aminoácidos (BAO et al., 2005; SCHALOSKE & DENNIS, 2006; BURKE & DENNIS, 2008). As PLA₂s encontradas na peçonha de cascavéis pertencem ao subgrupo IIA (SIX & DENNIS, 2000; DE PAULA et al., 2009) e apresentam uma grande variedade de efeitos farmacológicos, como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, além de efeitos sobre o sistema hemostático (MAGRO et al., 2004; SCHALOSKE & DENNIS, 2006, TEIXEIRA et al., 2011; TSAI et al., 2012). Devido a essa multiplicidade de atividade, as PLA₂ desempenham um papel muito importante na fisiopatologia do envenenamento.

As PLA₂s da peçonha de cascavéis são caracterizadas por apresentarem 120-125 resíduos de aminoácidos, sete pontes dissulfeto e massa molecular que varia entre 13 a 15 kDa (DENNIS et al., 2011; KINI, 1997). Essas enzimas podem ser subdivididas de

acordo com o resíduo encontrado na posição 49 em D49 PLA₂ que são cataliticamente ativas, e as que possuem baixa ou nenhuma atividade catalítica por possuírem a substituição desse resíduo por K, R, Q, A ou N (LOMONTE et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012; WEI et al., 2006).

As PLA₂ também podem ser classificadas de acordo com sua carga líquida, podendo ser ácidas (carga negativa), neutras ou básicas (carga positiva) (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; JAYANTHI & GOWDA, 1988). As PLA₂s ácidas possuem alta atividade catalítica e menos letais em camundongos quando comparadas às básicas (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; FERNANDÉZ et al., 2010; DENEGRI et al., 2010). Apesar disto, as PLA₂s ácidas podem induzir efeitos significativos como hipotensão, inibição da agregação plaquetária, além de efeitos anti-tumorais e bactericidas (SERRANO et al., 1999; FULY et al., 2002).

As PLA₂ presentes na peçonha das serpentes tem ação sobre a hemostasia, visando à imobilização e morte das presas (KINI, 2011). Essas enzimas atuam na agregação plaquetária, podendo ter efeitos indutores, inibidores ou aquelas que possuem efeito bifásico, ou seja, que podem induzir ou agregar a agregação das plaquetas dependendo da dose (ANDREWS & BERNDT, 2000). As PLA₂s também podem causar efeitos na coagulação, sendo classificadas como pró ou anti-coagulantes, interferindo nas diversas fases da cascata de coagulação (KINI, 2005; KINI, 2006).

A maior parte das toxinas da peçonha da cascavel brasileira já foi caracterizada, mas as PLA₂s ácidas dessa espécie ainda permanecem desconhecidas, provavelmente devido baixa concentração (2%) de PLA₂s ácidas na peçonha da subespécie mais estudada (*C. d. terrificus*) (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010; CUNHA & MARTINS, 2012; YONAMINE, 2013; MARLAS, 1982). Portanto, o presente trabalho pretende isolar as fosfolipases A₂ ácidas da peçonha de *C. d. cascavella* em estado puro, caracterizar estrutura e atividade biológica das mesmas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Peçonha e reagentes

Um *pool* de peçonha foi coletado, manualmente, de 45 serpentes da subespécie *Crotalus durissus cascavella* adultas, de ambos os sexos, mantidas no serpentário do Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas da Universidade Federal de Pernambuco (Licença SISBIO Nº 2611.29885/2009-PE), através de compressão manual das glândulas de peçonha. O substrato NOB (4-nitro-3-ácido octanoil benzóico, BML-ST506) foi obtido pela Enzo Life Sciences. Todos os demais reagentes utilizados foram de maior pureza disponível comercialmente.

3.2.2 Purificação

3.2.2.1 Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂

Alíquotas de 40 mg (peso seco) da peçonha de *C. d. cascavella* liofilizada foram diluídas em tampão A (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0) e submetidas à centrifugação (5000 rpm, 10 minutos, 4°C). A peçonha foi aplicada em uma coluna Resource Q pré-equilibrada com tampão A, em um fluxo de 5 ml/min. As proteínas ligadas foram eluídas por gradiente de tampão B (Tris-HCl 25mM, pH 8,0, contendo NaCl 1M). A principal fração eluída foi aplicada em coluna C18, previamente equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (tampão A). As corridas foram realizadas aplicando-se 5 a 50 ml da amostra, sendo as frações eluídas em gradiente linear de 5-100% de ácido trifluoroacético 0,1% em acetonitrila 50% (tampão B), em fluxo 10 ml/min.

Uma segunda fração proveniente da coluna Resource Q foi submetida a cromatografia em coluna Resource S pré-equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 7,3, contendo uréia 6M (tampão A). A fração eluída antes do gradiente de tampão B (tampão A contendo NaCl 1M) foi submetida à coluna C18, previamente equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (tampão A). As corridas foram realizadas aplicando-se 5 a 50 ml da amostra, sendo as frações eluídas em gradiente linear de 5-100% ácido trifluoroacético 0,1% em acetonitrila 60% (tampão B), em fluxo 10 ml/min.

A dosagem de proteínas foi determinada pela densidade óptica em 280 nm. A massa molecular das PLA₂s foi determinada por eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-

PAGE) e espectrometria de massa. A SDS-PAGE com e sem agente denaturante (2-mercaptopoetanol) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). A massa molecular das PLA₂s foi determinada por MALDI-TOF MS em um aparelho Voyager DE-PRO (Perceptive Biosystems, EUA). A matriz (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) foi preparada na concentração de 7-10 mg/mL em acetonitrila 30% - TFA 0,3 %, sendo aplicada (0,5 µl) sobre a placa metálica de análise. Sobre a gota da matriz foram aplicadas as amostras (0,5 µl) e, após 5 min, a placa contendo os cristais amostra-matriz foi inserida no espectrômetro de massas e irradiada com feixes de laser de nitrogênio (337 nm). A análise foi realizada no modo positivo linear, com calibração externa.

3.2.3 Caracterização Bioquímica

3.2.3.1 Determinação da atividade específica

A atividade fosfolipásica A₂ foi determinada segundo método de Lee et al. (1999) adaptado por Toyama et al. (2003) para placa de 96 poços. Para tanto, 220 µl de tampão (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, KCl 150 mM, pH 7,5), 20 µl de substrato (4-nitro-3-ácido octanoil benzóico - NOB, BML-ST506, Enzo Life Sciences) diluído em acetonitrila e 20 µl de amostra (10 µg) foram incubados por 40 min a 37 °C e a leitura a 425 nm foi realizada em intervalos de 10 min, em um espectrofotômetro Packard SpectraCount. A atividade específica foi expressa pela velocidade inicial da reação (V_o), baseada no aumento da densidade óptica após 40 minutos, obtida através da medida do número de moles de cromóforo liberados por minuto (Nº moles/min ou U) por miligrama de proteína.

3.2.3.2 Efeito da temperatura e pH na atividade fosfolipásica

Para avaliação da sensibilidade térmica, as PLA₂s foram aquecidas por 30 minutos a 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, e 95°C e resfriadas em banho de gelo. Para análise da estabilidade a diferentes pHs, as fosfolipases foram diluídas em acetato/fosfato/borato (PBA) 10 mM, nos valores de pH 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10 e 12. As amostras incubadas em diferentes temperaturas e pHs foram realizadas em duplicatas e submetidas a dosagem de atividade fosfolipásica segundo a metodologia descrita anteriormente.

3.2.3.3 Determinação da cinética enzimática

Para determinação do K_m e V_{max} das PLA₂s, a mesma metodologia descrita anteriormente foi realizada, utilizando 20 µl das fosfolipases (0,5 mg/ml) e diferentes concentrações do substrato NOB 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mM para a Cdca-I-PLA₂ e 0,06; 0,12; 0,24; 0,4; 0,5; 0,65; 0,08 e 1,0 mM para a Cdca-II-PLA₂ para um volume final de reação de 260 µl. Os ensaios foram realizados em triplicata. O gráfico e os valores de K_m e V_{max} foram obtidos a partir da utilização do programa GraphPadPrism 5.0.

3.2.3.4 Determinação do conteúdo de carboidratos

A concentração total de açúcar neutro em Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂ (15 e 30 µM) foi mensurada utilizando o método do fenol-ácido sulfúrico em placa de 96 poços, de acordo com Masuko e colaboradores (2005), através de uma curva padrão de D (+) - manose. Em cada poço foram adicionados 50 µl de manose (0-10 µg) ou 50 µl de cada fosfolipase (50 µg), 150 µl de ácido sulfúrico concentrado e 30 µl de fenol 5% (p/v) em água. A placa foi aquecida por cinco minutos a 90°C e resfriada a temperatura ambiente por cinco minutos. A leitura foi realizada a 490 nm em um leitor de microplaca Spectra CountTM.

3.2.3.5 Determinação da sequência de aminoácidos

A sequência das PLA₂s foi analisada por MALDI-TOF/MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight/Mass Spectrometry). As PLA₂ foram desnaturadas e reduzidas pela adição de 200 µL de tampão Tris-HCl 0,25 M, pH 8,5 contendo guanidina-HCl 6,0 M e EDTA 1mM, homogeneizado com 5 mg de ditiotreitol. A reação foi incubada no escuro, a 37°C por 2 horas, sob atmosfera de nitrogênio. Posteriormente, as amostras foram alquiladas com iodoacetamida e submetidas a uma digestão com tripsina, quimotripsina, Asp-N e Lys-C, utilizando uma razão enzima/proteína de 1:50. Peptídeos gerados pela digestão das fosfolipases foram adicionados a 1 µl da matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico saturada (10 mg/ml), e esta reação foi colocada na placa de aço do espectrômetro de massa, a temperatura ambiente. Os calibrantes utilizados foram insulina, ubiquitina, citocromo C e mioglobina.

O espectro de massa foi obtido em um especlômetro Bruker Daltonics Microflex LT (Billerica, EUA). Os espectros foram obtidos em modo refletor com ionização positiva.

As sequências de peptídeos obtidas foram comparadas com outras sequências de fosfolipases depositadas em banco de dados. Para a comparação, o programa protein blast, acessível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> foi utilizado, e o alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Multalin (MultipleAlignment), acessível em: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.

3.2.4 Caracterização Biológica

3.2.4.1 Atividade proteolítica

As atividades serinoprotease das PLA₂s foram realizadas utilizando o substrato cromogênico sintético N-benzoil-DL-arginina pnitroanilida (BApNA) e Tos-gly-Pro-Arg-AMC (0,5 M) para atividades tipo tripsina e trombina, respectivamente. As fosfolipases (15 e 30 µM) foram incubadas com o BApNA por 60 minutos a 37°C em placa de 96 poços. A liberação da cor pela ação enzimática foi monitorada a cada 5 min, a 405 nm, usando o espectrofômetro Packard, SpectraCount. A atividade enzimática foi analisada com o tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 contendo 0,02% CaCl₂, v/v. Para a atividade tipo trombina, as PLA₂s (15 e 30 µM) foram incubadas por 40 minutos a 37°C com o substrato fluorogênico Tos-gly-Pro-Arg-AMC (0,5 M) em placa de 96 poços. A liberação do fluoróforo foi monitorada a cada 10 minutos, a 440 nm, usando o espectrofômetro Packard, SpectraCount. A atividade enzimática foi analisada com o tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 contendo NaCl 0,15M, polietilenoglicol (PEG) 8000 0,1%.

3.2.4.2 Determinação da atividade hemaglutinante (AH)

Para avaliar a capacidade das PLA₂ em aglutinar eritrócitos, foram realizados ensaios de atividade hemaglutinante (CORREIA & COELHO, 1995) utilizando a suspensão de eritrócitos humanos (A+) fixados com glutaraldeído a 1%, em microplaca de 96 poços com fundo côncavo. Para isso, inicialmente 50 µl de NaCl a 0,15 M foram adicionados em cada poço da placa. Em seguida, foram adicionados 50 µl de Cdca-I-PLA₂ ou Cdca-

II-PLA₂ a 30 µM e sucessivas diluições foram realizadas. O controle positivo foi realizado utilizando 50 µl de Concanavalina A (400 µg), diluídos serialmente com salina. O controle negativo foi realizado adicionando NaCl a 0,15M nos poços da primeira coluna da placa. Após a preparação das amostras e controles, 50 µl da suspensão de eritrócitos tratados com glutaraldeído a 1% foram adicionados em cada poço. A atividade hemaglutinante foi observada a olho nu, após incubação da microplaca a temperatura ambiente por 45 minutos e definida como a menor concentração de proteína capaz de aglutinar eritrócitos.

3.2.4.3 Atividade sobre plaquetas

Sangue venoso foi coletado de doadores saudáveis em uma solução de 3,8% de citrato de sódio e centrifugado a 141 g por 12 minutos a temperatura ambiente, para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido pela centrifugação do sangue a 1200 g por 15 minutos. O número de plaquetas foi computado em um contador de células Counter KX-21N e ajustado para uma concentração final de 3 x 10⁸/ml com PPP. Uma bolsa de plaquetas lavadas foi obtida da Associação Beneficente de Coleta de sangue (COLSAN). A agregação plaquetária foi acompanhada pelo método turbidimétrico de Born e Cross (1963). As frações provenientes da cromatografia em C18 (50 µl) foram incubadas com PRP (450 µl), ácido araquidônico (0,5 mM), ADP (10 µM), adrenalina (50 mM) e colágeno (2 µg/ml) e a agregação foi monitorada a 37°C por 6 min em um agregômetro da Chrono-log Corporation. Os ensaios foram realizados em duplicata e os controles de cada experimento foram realizados com solução salina 0,15M. Para os testes de inibição, diferentes concentrações de Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂ foram adicionadas ao plasma 5 minutos antes da adição dos agonistas.

3.2.4.4 Atividade coagulante

3.2.4.4.1 *Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)*

O sangue foi coletado de doadores adultos saudáveis, em uma solução de citrato de sódio 3,8% (p/v). O plasma foi obtido por centrifugação a 1726 g, por 10 minutos, a temperatura ambiente (25° C). Para a obtenção do TTPa, um pool de plasma humano (50 µl) foi adicionado a 50 µl das PLA₂s, seguido da adição de 50 µl do reagente para TTPa

(Dade actin activated cephaloplastin). A reação foi incubada por 120 segundos a 37º C. Após a incubação, foram adicionados 50 µl de CaCl₂ 0,025M e o tempo de formação do coágulo foi aferido em um coagulômetro da marca Dade Berhing. Como controle foi utilizado 50 µl de NaCl 0,15 M. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos em função de R (razão entre tempo de coagulação de cada amostra e o tempo de coagulação do controle). A concentração de PLA₂ capaz de inibir 50% da coagulação (IC₅₀), quando comparada ao controle, foi determinada pelo GraphPad Prism5.

3.2.4.4.2 Tempo de protrombina (TP)

Para a obtenção do TP, um pool de plasma humano (50 µl) foi adicionado a 50 µl das PLA₂s. A reação foi incubada por 60 segundos a 37º C. Após a incubação, foram adicionados 100 µl do reagente para TP (Thromborel S) e o tempo de formação do coágulo foi aferido em um coagulômetro da marca Dade Berhing. Como controle foi utilizado 50 µl de NaCl 0,15 M. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos em função de R (razão entre tempo de coagulação de cada amostra e o tempo de coagulação do controle) A concentração de PLA₂ capaz de inibir 50% da coagulação (IC₅₀), quando comparada ao controle, foi determinada pelo GraphPad Prism 5.

3.2.4.4.3 Tempo de Trombina (TT)

Para a obtenção do TT, inicialmente 5 µl de trombina (0,1 U/ µl) foram incubados com 70 µl de NaCl 0,15 M (controle) ou Cdca-I-PLA₂ (concentração final 10 µM) ou Cdca-II-PLA₂ (concentração final 10 µM ou 20 µM). Após 2 minutos a 37º C, um pool de plasma humano (75 µl) foi adicionado e o tempo de formação do coágulo foi aferido em um coagulômetro da marca Dade Berhing. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos em função de R (razão entre tempo de coagulação de cada amostra e o tempo de coagulação do controle).

3.2 RESULTADOS

3.3.1 Purificação

3.3.1.1 Cdca-I-PLA₂

A fosfolipase, denominada Cdca-I-PLA₂, foi purificada a partir de duas etapas cromatográficas: a separação da peçonha bruta de *C. d. cascavella* em coluna Resource Q em seis principais frações (Figura 9A), seguida da cromatografia de Q5 em coluna C18 (Figura 9B). A Cdca-I-PLA₂ apresentou atividade fosfolipásica específica de $11,51 \pm 0,5$ U/mg, uma única banda em SDS-PAGE (Figura 9C) e massa molecular de 14.247 Da, além de sua forma duplamente ionizada de 7.125 Da estimada por espectrometria de massa (Figura 9D).

3.3.1.2 Cdca-II-PLA₂

A fosfolipase denominada Cdca-II-PLA₂, foi purificada a partir de três etapas cromatográficas: fração Q2 (Figura 10A), proveniente da separação da peçonha bruta de *C. d. cascavella* em coluna Resource Q, foi submetida à cromatografia em coluna Resource S (Figura 10B). A fração eluída antes do gradiente de tampão B (Q2S) foi cromatografada em coluna C18 (Figura 10C) e a pureza da Cdca-II-PLA₂ foi confirmada por SDS-PAGE (Figura 10D) e espectrometria de massa, apresentando uma massa molecular de 14.418 Da (Figura 10E) e atividade fosfolipásica específica de $26,75 \pm 0,15$ U/mg.

Figura 9. Purificação da Cdca-I-PLA₂. A: Cromatografia da peçonha *C. d. cascavella* em coluna Resource Q (6 ml). A corrida foi realizada utilizando 40 mg de peçonha diluídas em 1 ml de tampão Tris-HCl 25 mM pH 8 (A), seguida de eluição em gradiente de tampão Tris-HCl 25 mM pH 8 contendo 1 M de NaCl, em fluxo de 5 ml/min. B: Cromatografia de fase reversa da fração Q5 da peçonha de *C. d. cascavella* aplicada em coluna C18. A corrida foi realizada em TFA 0,1%, seguida de eluição em gradiente linear (5-100%) em tampão acetonitrila 50% contendo TFA 0,1%, em fluxo de 10 ml/min C: análise da comparação da eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) entre Cdca-I-PLA₂ sem agente denaturante (NR) ou com agente denaturante (R) e padrão de eletroforese Thermo Fisher. D: espectrometria de massa MALDI-TOF da Cdca-I-PLA₂.

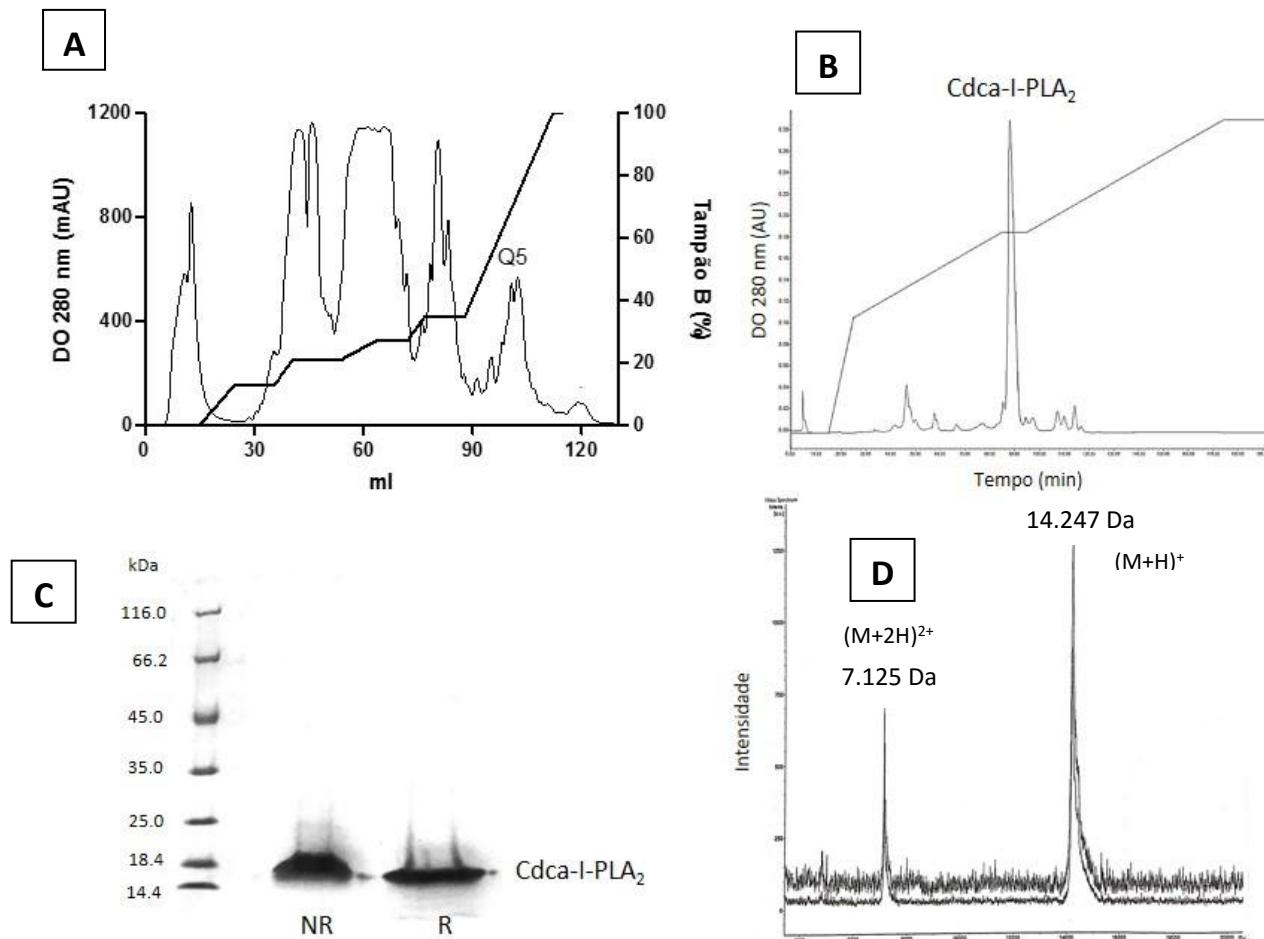
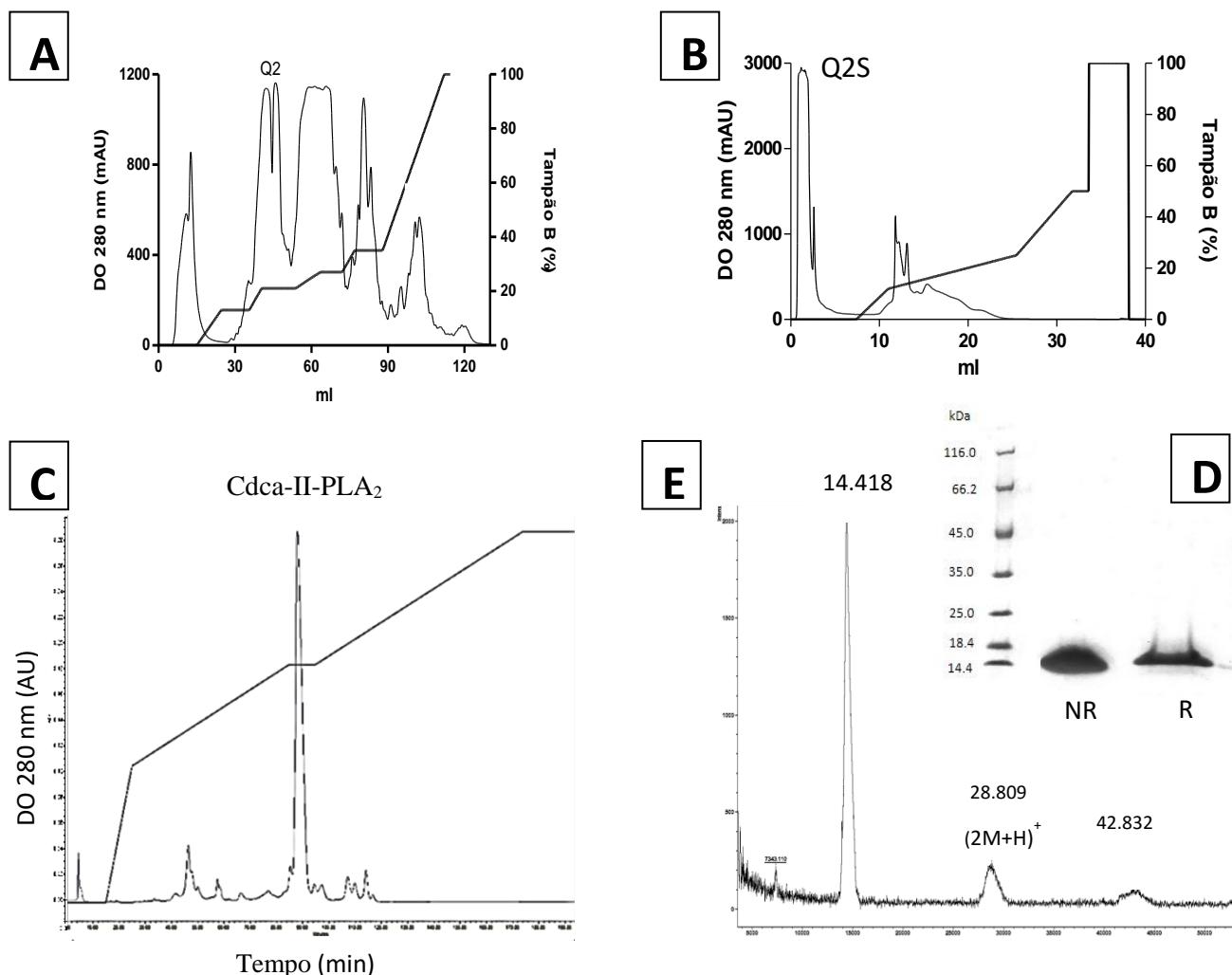


Figura 10. Purificação da Cdca-II-PLA₂. A: Cromatografia da peçonha *C. d. cascadella* em coluna Resource Q (6 ml). A corrida foi realizada utilizando 40 mg de peçonha diluídas em 1 ml de tampão Tris-HCl 25 mM pH 8 (A), seguida de eluição em gradiente de tampão Tris-HCl 25 mM pH 8 contendo 1 M de NaCl, em fluxo de 5 ml/min. B: Cromatografia de troca iônica da fração Q2 em coluna Resource S. As corridas foram realizadas em Tris-HCl 50Mm pH 7,3 contendo uréia 6M (tampão A), seguida de gradiente de tampão B (tampão A contendo NaCl 1M). C: A fração eluída antes do gradiente foi submetida à coluna C18, realizada em TFA 0,1%, seguida de eluição em gradiente linear (5-100%) em tampão acetonitrilo 60% contendo TFA 0,1%, em fluxo de 10 ml/min previamente equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (tampão A). D: análise da comparação da eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) entre Cdca-II-PLA₂ sem agente denaturante (NR) ou com agente denaturante (R) e padrão de eletroforese Thermo Fisher. E: espectrometria de massa MALDI-TOF da Cdca-II-PLA₂.

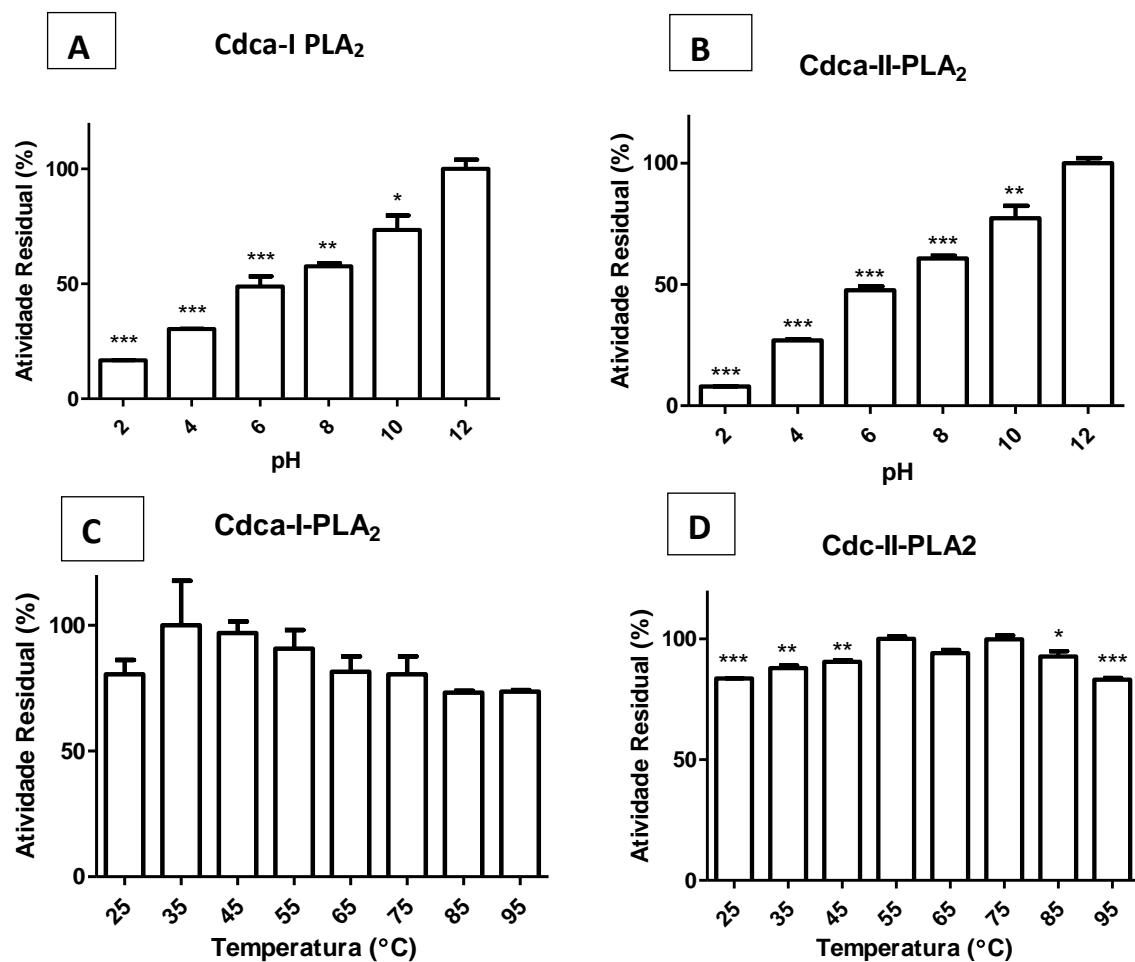


3.3.2 Caracterização Bioquímica

3.3.2.1 Efeito do pH e temperatura na atividade fosfolipásica

As fosfolipases foram igualmente sensíveis à mudança de pH, apresentando atividade diretamente proporcional ao aumento do pH (Figura 11A e 11B). Ambas as PLA₂ apresentaram atividade enzimática em todas as temperaturas testadas, com pequenas reduções da atividade nas temperaturas mais altas e mais baixas.

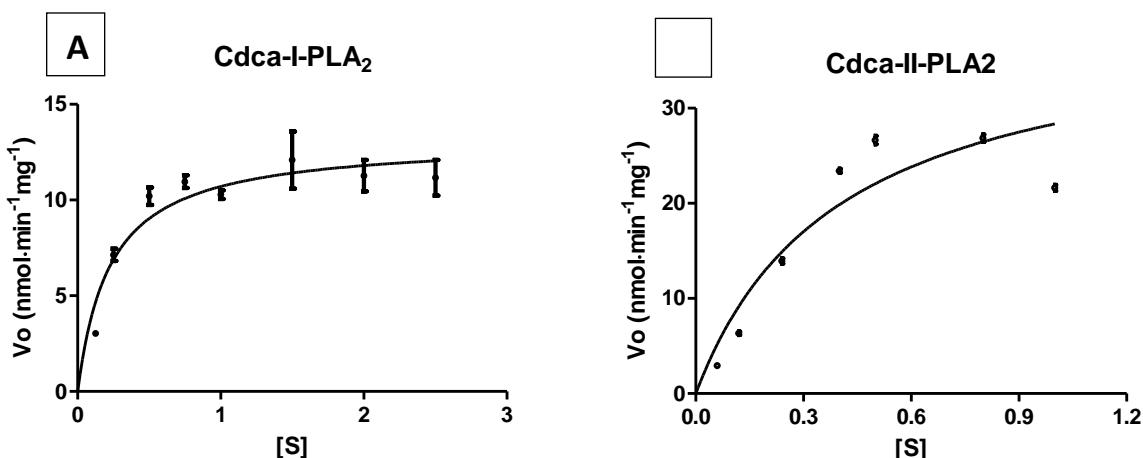
Figura 11. Efeito do pH e temperatura na atividade fosfolipásica. Efeito do pH do tampão de amostra na atividade fosfolipásica de Cdca-I-PLA₂ (A) e Cdca-II-PLA₂ (B). Efeito da temperatura de incubação prévia (10 minutos) sobre a atividade fosfolipásica de Cdca-I-PLA₂ (C) e Cdca-II-PLA₂ (D) (*p> 0,05; **p>0,01; ***p>0,001 em relação à maior atividade detectada).



3.3.2.2 Determinação da cinética enzimática

Ambas PLA₂s apresentaram atividade sobre o substrato NOB, porém Cdca-II-PLA₂ foi mais ativa que Cdca-I-PLA₂. As velocidades máximas estimadas para Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂ foram 13,15 e 39,68 nmol×min⁻¹mg⁻¹ e K_m foram 0,2280 e 0,3993 mM, respectivamente (Figura 12).

Figura 12. Cinética enzimática determinada de Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂. O ensaio foi realizado seguindo o método de Lee et al. (1999) adaptado por Toyama et al. (2003) para placa de 96 poços. **A:** Cdca-I-PLA₂ (0,5 mg/ml) testada sobre as diferentes concentrações de substrato NOB (0,125; ,25; 0,5;1,0; 1,5. 2,0 e 2,5). **B:** Cdca-II-PLA₂ (0,5 mg/ml) testada sobre as diferentes concentrações de substrato NOB (0,125; ,25; 0,5;1,0; 1,5. 2,0 e 2,5).



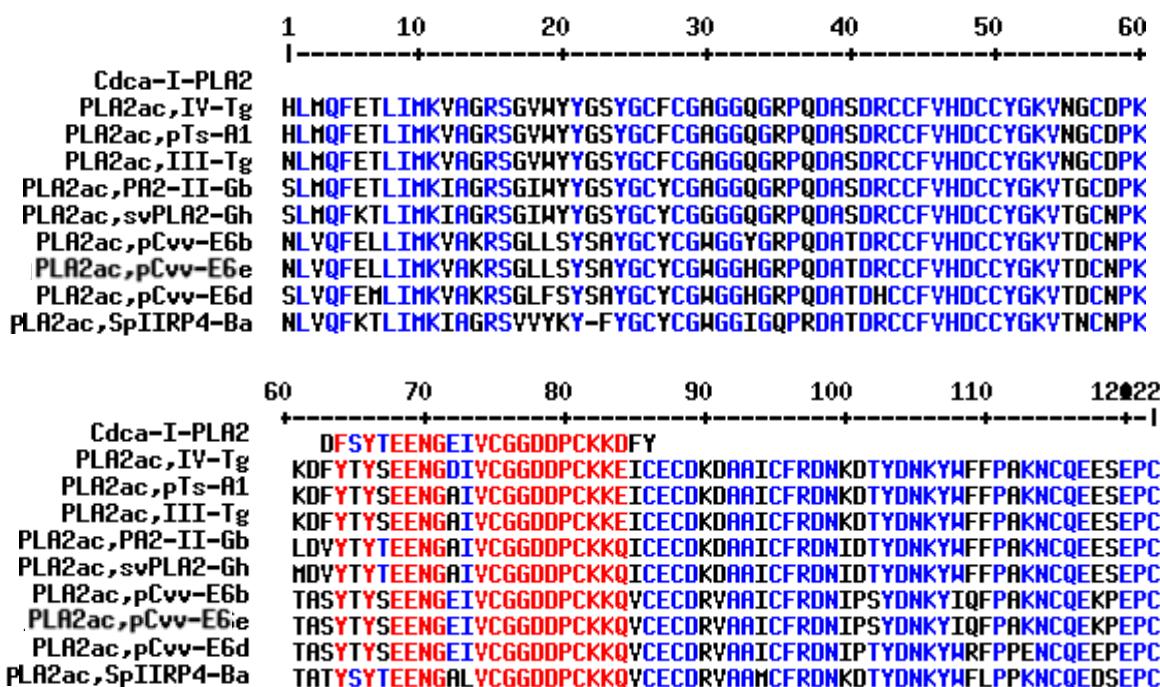
3.3.2.3 Determinação do conteúdo de carboidratos

Em ambas PLA₂s foi detectada a presença de carboidratos neutros, em uma proporção de 2,72% e 2,92%, respectivamente.

3.3.2.4 Determinação de sequência de aminoácidos

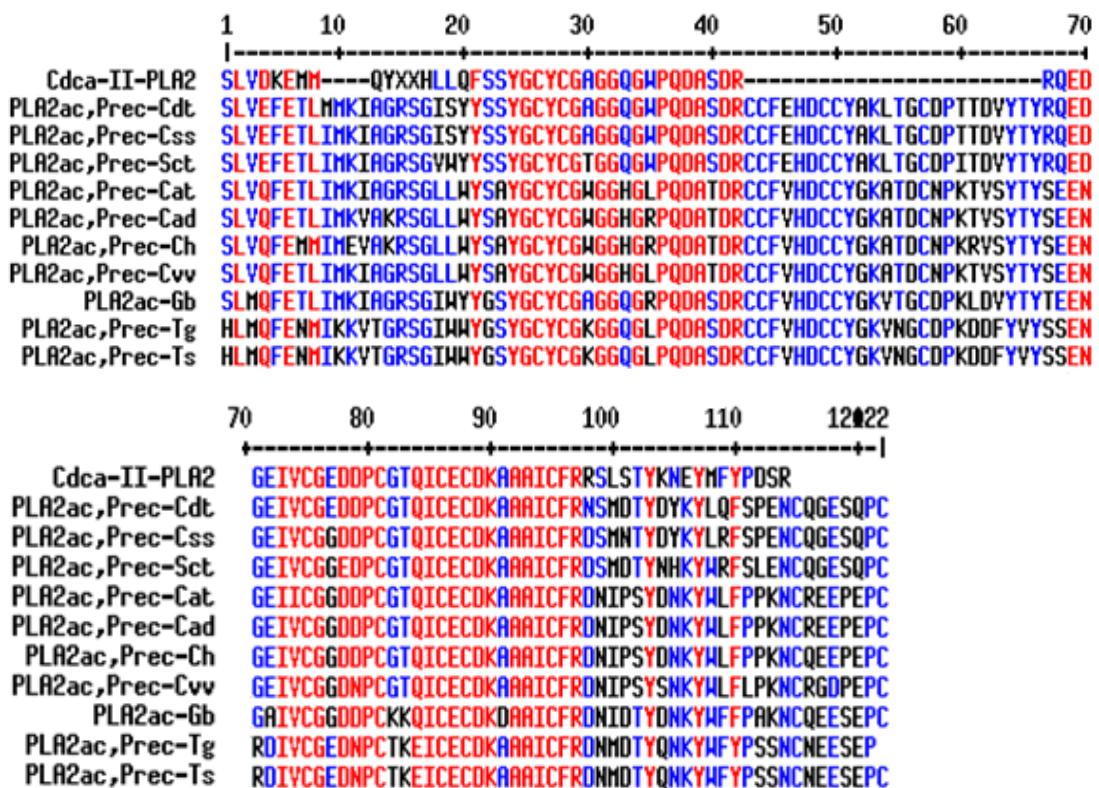
O sequenciamento de aminoácidos de Cdca-I-PLA₂ resultou na obtenção de uma sequência contendo 24 resíduos, apresentando homologia com outras sequências na posição 64 a 88. Essa sequência tem similaridade com outras isoformas de PLA₂ ácidas purificadas da peçonha de várias serpentes da família Viperidae: *Trimeresurus gramineus*, *Crotalus viridis viridis*, *Trimeresurus stejnegeri*, *Gloydius blomhoffii*, *G. halys* e *Bothrops alternatus* (Figura 13).

Figura 13. Alinhamento múltiplo da sequência da Cdca-I-PLA₂ ((Número de acesso: 199376) e outras fosfolipases de peçonha de serpentes. PLA₂-IV-Tg: PLA₂ ácida de *Trimeresurus gramineus* (81479), Pts-A1: precursor da PLA₂ ácida Ts-A1 de *Trimeresurus stejnegeri* (Q6H3D0), III-Tg: PLA₂ ácida III de *Trimeresurus gramineus* (P81480), PA2-II-Gb: PLA₂ ácida PA2-II de *Gloydius blomhoffii* (P20249), svPLA₂-Gh: PLA₂ ácida Sv-PLA₂ de *Gloydius halys* (O42192), pCvv-E6b: precursor da PLA₂ ácida Cvv-E6b de *Crotalus viridis viridis* (Q7ZTA6), pCvv-E6e: precursor da PLA₂ ácida Cvv-E6e de *C. v. viridis* (Q7ZTA7), pCvv-E6b: precursor da PLA₂ ácida Cvv-E6b de *C. v. viridis* (Q7ZTA8), SpIIRP4-Ba: PLA₂ ácida SpIIRP4 de *Bothrops alternatus* (P86456). O peptídeo sinal foi omitido das sequências dos precursores.



A partir do sequenciamento de Cdca-II-PLA₂ foi possível obter três sequências que totalizaram 72 resíduos de aminoácidos. A sequência N-terminal apresentou oito resíduos de aminoácidos sequenciados. A segunda sequência apresentou 30 resíduos entre as posições 13 a 42, e por fim, a terceira sequência contendo 34 aminoácidos apresentou homologia nas posições de 67 a 114 das fosfolipases de outras serpentes da família Viperidae. Essa fosfolipase A₂ apresentou homologia principalmente para moléculas precursoras de isoformas de crotapotina ou similares clonadas das peçonhas de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus scutulatus scutulatus* e *Sistrurus catenatus tergeminus*, bem como com várias isoformas ácidas clonadas de *Crotalus atrox*, *Crotalus adamanteus*, *Crotalus horridus*, *Crotalus viridis viridis*, *Trimeresurus gramineus* e *Trimeresurus stejnegeri* (Figura 14).

Figura 14. Alinhamento múltiplo da sequência da Cdca-II-PLA2 (Número de acesso: 6480) e outras fosfolipases de peçonha de serpentes. Prec-Ctd: PLA₂ ácida precursora da crotapotina de *Crotalus durissus terrificus* (P08878), Prec-Css: PLA₂ ácida precursora da subunidade ácida da Mojave toxina de *Crotalus scutulatus scutulatus* (P18998), Prec-Sct: PLA₂ ácida precursora da subunidade ácida da sustroxina A de *Sistrurus catenatus tergeminus* (Q6EAN6), Prec-Cat: Precursor da PLA₂ ácida de *Crotalus atrox* (P00624), Prec-Cad: Precursor de PLA₂ ácida beta de *Crotalus adamanteus* (P00623), Prec-Ch: Precursor de PLA₂ ácida CH-E6 de *Crotalus horridus* (D6MKR0), Prec-Cvv: Precursor de PLA₂ ácida Cv_v-E6a de *Crotalus viridis viridis* (Q800C4), PLA₂ ac-Gb: PLA₂ ácida PA2-II de *Ghoydius blomhoffii* (P20249), Prec-Tg: Precursor de PLA₂ ácida sv-PLA₂ de *Trimeresurus gramineus* (P70088), Prec-T2: Precursor de PLA₂ ácida TS-A6 de *Trimeresurus stejnegeri* (Q6H3C8). O peptídeo sinal foi omitido das sequências dos precursores.

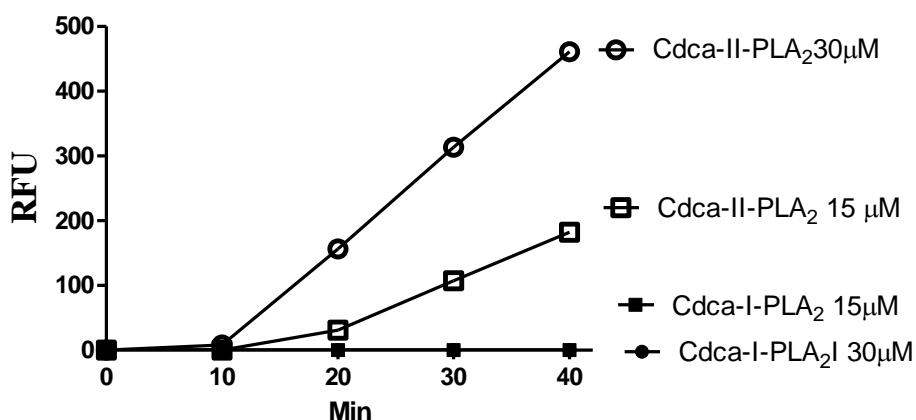


3.3.3 Caracterização Biológica

3.3.3.1 Atividade proteolítica

Tanto a Cdca-I-PLA₂ quanto a Cdca-II-PLA₂ não apresentaram atividade tipo tripsina sobre o substrato BApNA. Por outro lado, embora a enzima Cdca-I-PLA₂ não tenha apresentado atividade tipo trombina, a Cdca-II-PLA₂ mostrou atividade dose dependente (Figura 15).

Figura 15. Atividade tipo trombina das fosfolipases. Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂ incubadas durante 40 minutos a 37°C com o substrato fluorogênico Tos-gly-Pro-Arg-AMC (0,5 M), em microplaca, e as leituras realizadas a 440 nm.



3.3.3.2 Determinação da atividade hemaglutinante (AH)

A Concanavalina A (controle positivo) apresentou atividade hemaglutinante com título de 128 e dose mínima hemaglutinante de 6,25 μM. A Cdca-I-PLA₂ apresentou um título de 4, correspondendo a uma dose mínima hemaglutinante de 15 μM. Por outro lado, a Cdca-II-PLA₂ não apresentou atividade aglutinante quando testada em hemácias humanas do tipo A +.

3.3.3.3 Atividade sobre plaquetas

Ambas PLA₂s não apresentaram efeito sobre agregação plaquetária em PRP quando utilizadas como agonistas, e também não promoveram qualquer alteração na agregação plaquetária induzida por ADP (dados não mostrados). Por outro lado, apesar de ambas apresentarem efeito inibitório na agregação plaquetária em PRP quando colágeno, adrenalina e ácido araquidônico foram utilizados como agonistas, a ação das duas PLA₂s não foi idêntica.

Cdca-I-PLA₂ inibiu a agregação de plaquetas de forma dose dependente quando induzida por colágeno (a partir da dose de 2 μM, p<0,001) (Figura 16A) e adrenalina (0,2 μM, p<0,01) (Figura 16B). Em relação à agregação induzida pelo ácido araquidônico, a Cdca-I- PLA₂ inibiu completamente a agregação nas doses de 0,7 μM a 20 μM (p<0,001), perdendo a capacidade de inibição na dose de 0,2 μM (Figura 8C). Nesses experimentos não foi observado um efeito dose resposta (Figura 16C).

A Cdca-II-PLA₂ apresentou atividade inibitória dose resposta na agregação induzida por colágeno (Figura 17A) e ácido araquidônico (Figura 17C) nas doses de 0,2 μM a 20 μM. Essa PLA₂ apresentou efeito inibitório sobre plaquetas (PRP) quando a adrenalina foi utilizada como agonista, inibindo completamente a agregação plaquetária em todas as doses testadas (0,02 μM a 20 μM) (Figura 17B).

Figura 16. Efeito da Cdca-I-PLA₂ na agregação plaquetária em PRP. (A) Efeito sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno. (B) Efeito sobre a agregação plaquetária induzida por adrenalina. (C) Efeito sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico. A agregação plaquetária foi determinada em agregômetro. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Os resultados foram obtidos em dois ensaios independentes e em duplicita. (**p>0,01; ***p>0,001).

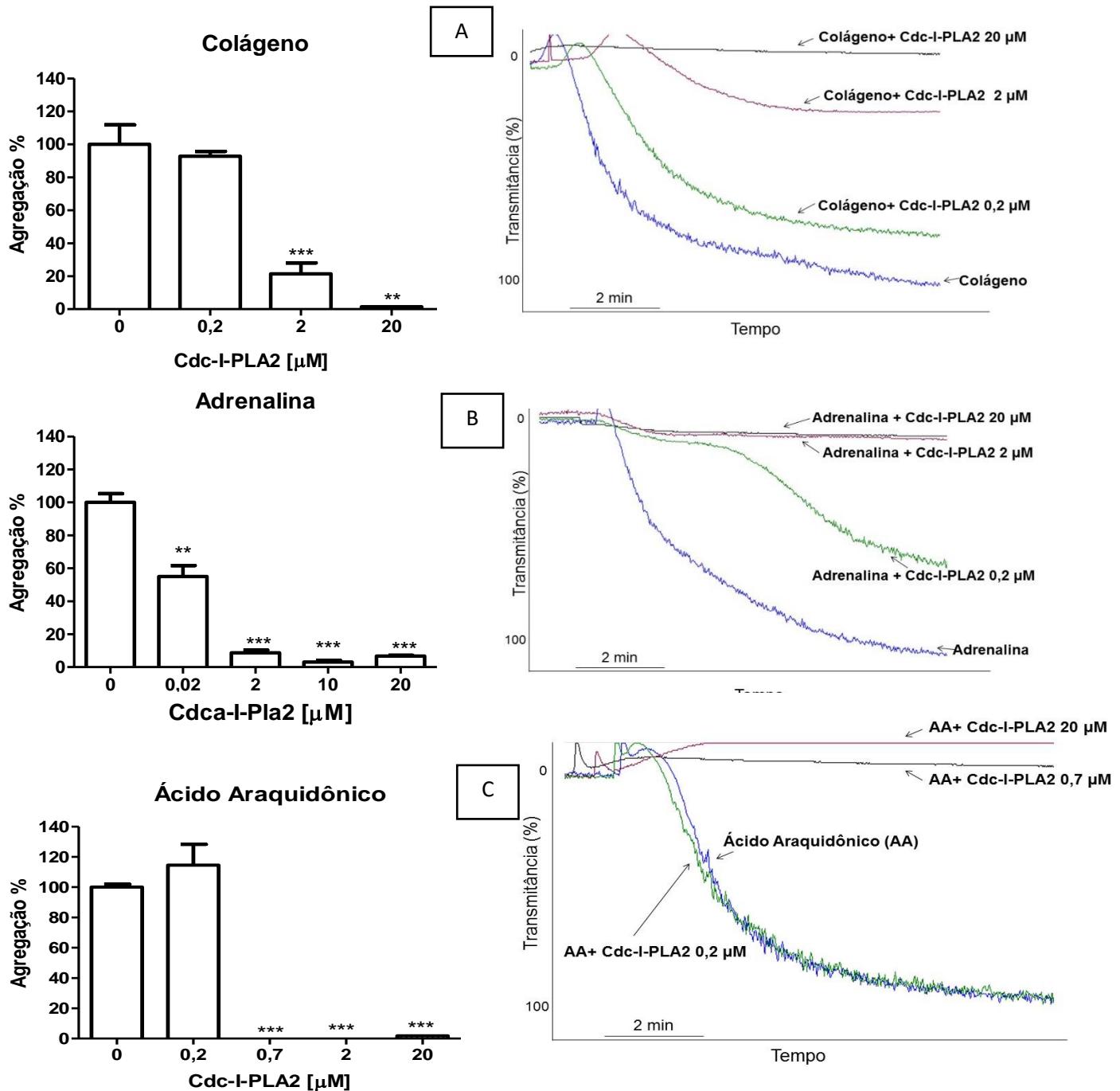
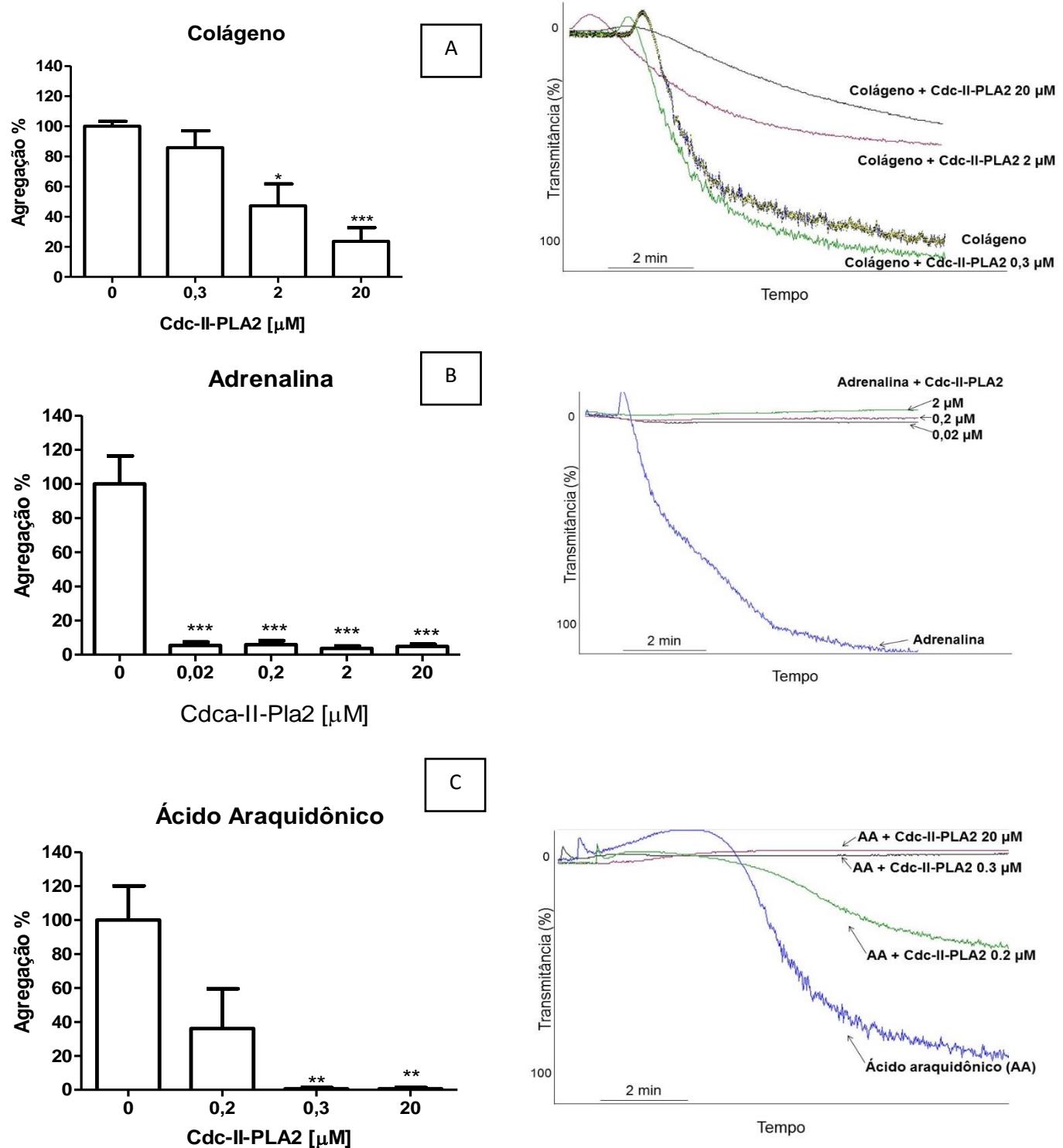
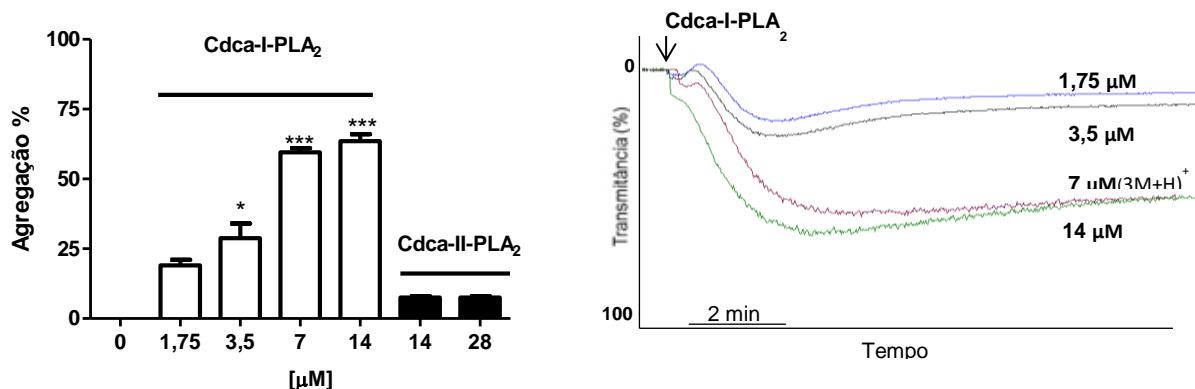


Figura 17. Efeito da Cdca-II-PLA₂ na agregação plaquetária em PRP. A. Efeito sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno. B. Efeito sobre a agregação plaquetária induzida por adrenalina. C. Efeito sobre a agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico. A agregação plaquetária foi determinada em agregômetro. As barras representam as médias ± desvio padrão. Os resultados foram obtidos em dois ensaios independentes e em duplicita. (*p>0,05; **p>0,01; ***p>0,001).



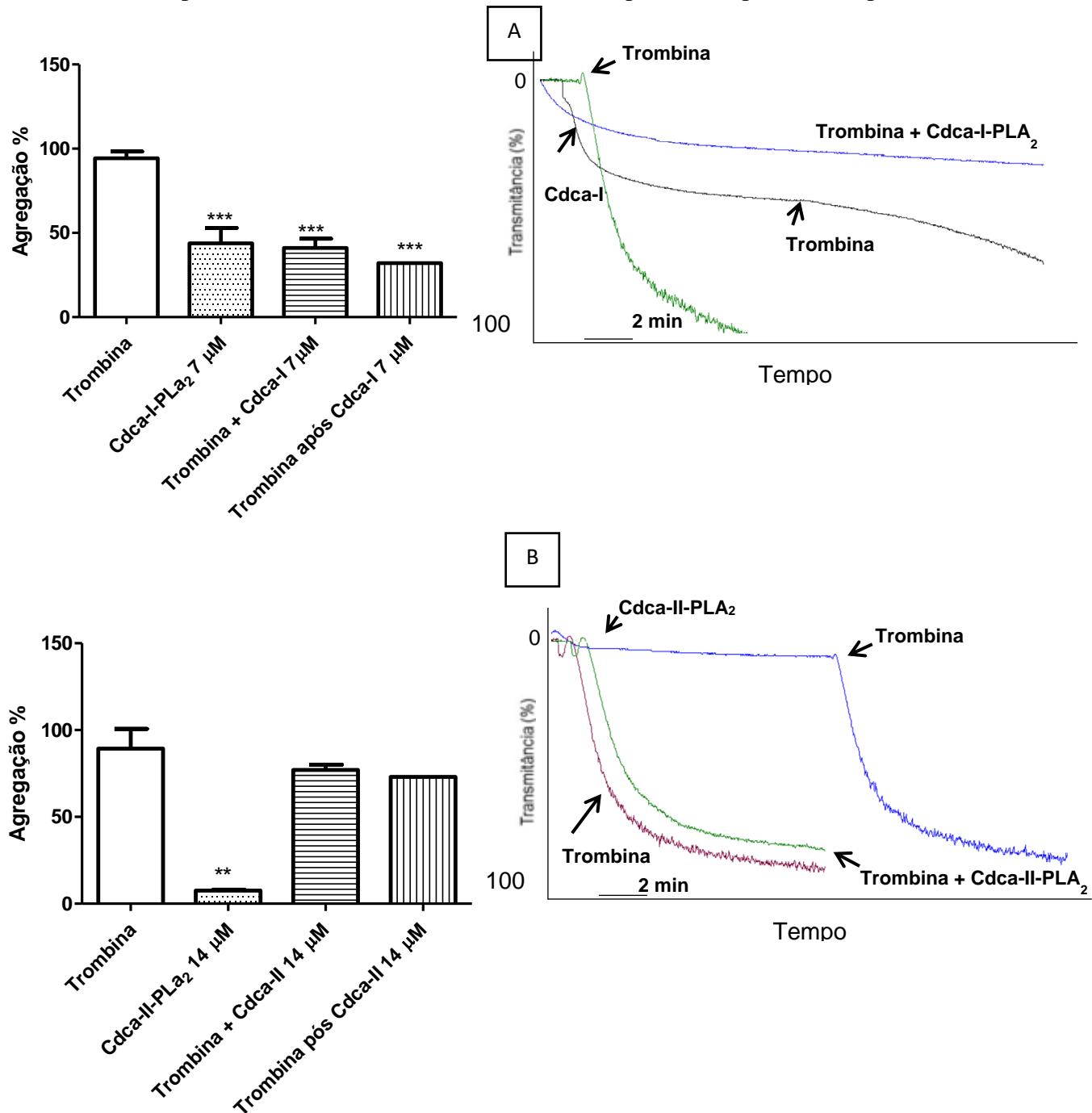
Os resultados dos ensaios com plaquetas lavadas identificaram diferenças na resposta das duas fosfolipases. Ao invés de inibirem a agregação, a Cdca-I-PLA₂ induziu agregação quando utilizada como agonista de forma dose dependente (3,5 μM a 14 μM) e a Cdca-II-PLA₂, mesmo na dose de 28 μM, não apresentou qualquer efeito nas plaquetas lavadas (Figura 18).

Figura 18. Efeito da Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂ na agregação de plaquetas lavadas. Efeito de diferentes doses das fosfolipases como agonistas de agregação. A agregação plaquetária foi determinada em agregômetro. As barras representam as médias ± desvio padrão. Os resultados foram obtidos em duplicita. (*p>0,05; ***p>0,001).



Por outro lado, quando comparamos quatro diferentes formas de testar a agregação plaquetária induzida por trombina com as PLA₂ (capacidade de agregação plaquetária da trombina em si; efeito de cada PLA₂ na agregação das plaquetas; efeito de cada PLA₂ na agregação plaquetária quando incubada previamente com trombina por 5 minutos; e a adição de trombina às plaquetas 5 minutos após a adição de cada PLA₂) observamos que a Cdca-I-PLA₂ reduziu significativamente a capacidade da trombina agregar as plaquetas em ambos os experimentos (Figura 19A), enquanto a Cdca-II-PLA₂ não apresentou qualquer efeito (Figura 19B).

Figura 19. Efeito das fosfolipases na agregação de plaquetas lavadas na presença e ausência de trombina. (A) Efeito da Cdca-I-PLA₂. (B) Efeito da Cdca-II-PLA₂. Trombina + Cdca: medida da agregação por trombina e PLA₂, incubadas a 37° C, por 5 minutos, antes da adição às plaquetas. Trombina após Cdca: medida da agregação devido a trombina adicionada 5 minutos após a incubação Cdca às plaquetas. O efeito da agregação plaquetária foi determinada em agregômetro. As barras representam as médias ± desvio padrão. Os resultados foram obtidos em duplicata. (**p>0,01; ***p>0,001).

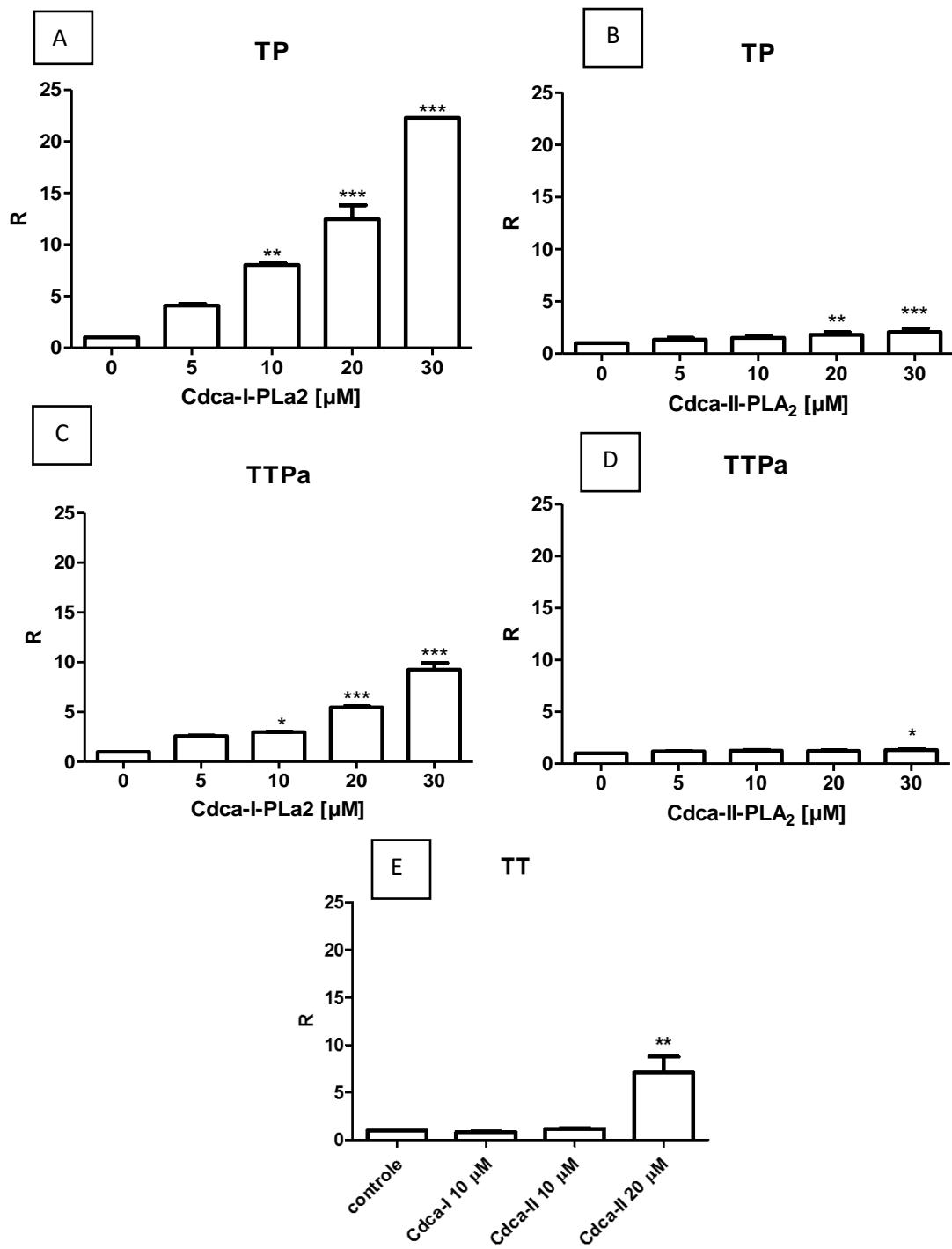


3.3.3.4 Atividade coagulante

Os resultados da determinação do TTPa e TP mostraram que as duas PLA₂s apresentaram atividade anticoagulante dose dependente nas concentrações de 10 a 30 μM, prolongando mais o TP do que o TTPa. Na maior dose testada, o TP foi prolongado em mais de 20 vezes por ação das Cdca-I-PLA₂ ($IC_{50} = 0,22 \mu M$, Figura 20A) e, aproximadamente, duas vezes pelo efeito da Cdca-II-PLA₂ ($IC_{50} = 5,9 \mu M$, Figura 20B). A maior atividade anticoagulante da Cdca-I-PLA₂ ($IC_{50} = 1,4 \mu M$) também foi evidenciada pelos resultados do TTPa, promovendo um aumento de mais de 10 vezes no mesmo (Figura 20C), enquanto a Cdca-II-PLA₂ ($IC_{50} = 1,1 \mu M$) induziu apenas discreto prolongamento deste tempo ($R < 1,5$) (Figura 20D).

Devido a pequena quantidade de amostra, o TT só foi realizado na dose de 10 μM de Cdca-I-PLA₂ não apresentando qualquer alteração em relação ao controle. Por outro lado, embora a Cdca-II-PLA₂ não tenha alterado o TT na dose de 10 μM, a mesma apresentou significativa atividade anticoagulante na dose de 20 μM, prolongando aproximadamente 7 vezes o TT em relação ao controle (Figura 20E).

Figura 20. Efeito das fosfolipases na coagulação. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) de Cdca-I-PLA₂ (A) e de Cdca-II-PLA₂ (B). Tempo de Protrombina (TP) de Cdca-I-PLA₂ (C) e de Cdca-II-PLA₂ (D). Tempo de Trombina (TT) de Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂ (E). As barras representam as médias ± desvio padrão. Os resultados foram obtidos em dois ensaios independentes e em duplicata. (*p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001 em relação ao controle com NaCl 0,15M).



3.4 DISCUSSÃO

Dentre as toxinas que compõem a peçonha das serpentes estão as fosfolipases A₂, enzimas que representam um dos principais componentes desta secreção. As PLA₂ apresentam uma grande variedade de atividades tóxicas, apesar das restrições estruturais impostas por sua estrutura conservada e rica em pontes dissulfeto (KINI, 2003; JIMENEZ-CHARRIS et al., 2016; RESENDE et al., 2017).

Neste estudo, duas novas fosfolipases A₂ ácidas com ação na hemostasia e com atividades ainda não descritas para esta classe, Cdca-I-PLA₂, possivelmente, uma quimerolectina e Cdca-II-PLA₂ um inibidor de trombina, foram purificadas com sucesso da peçonha de *C. d. cascadella*.

Os resultados da atividade fosfolipásica e espectrometria de massa das frações cromatográficas sugerem que na primeira etapa de purificação (Resource Q), comum às duas novas fosfolipases, ocorreu a eluição da maior parte da crotoxina na forma dimérica (fração Q2), bem como das subunidades isoladas: fosfolipásica básica (fração não retida) e crotapotina ácida (fração Q5). Estes resultados foram confirmados pelo monitoramento da atividade fosfolipásica A₂ em cada fração eluída da coluna Resource Q (dados não mostrados), onde o pico Q2 apresentou maior atividade fosfolipásica, sugerindo que a crotoxina, toxina com atividade fosfolipásica mais abundante da peçonha de *Crotalus durissus* (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010), eluiu nesta fração.

A Cdca-I-PLA₂ é uma fosfolipase ácida, provavelmente com pI entre 3 e 4 por comparação com a crotapotina (pI 3,4) que foi eluída na mesma fração na primeira etapa de purificação. A presença da crotapotina nessa fração foi confirmada por espectrometria de massas (dados não mostrados). A Cdca-I-PLA₂ foi purificada em apenas duas etapas cromatográficas e está em baixa concentração na peçonha de *C.d. cascadella*, em torno de 0,3%.

Para isolar a Cdca-II-PLA₂ foi necessário incluir mais uma etapa cromatográfica, porque a Cdca-II-PLA₂ foi eluída na mesma fração da crotoxina (pI 4,7) na cromatografia em Resource Q (fração Q2), o que confirmou o seu caráter ácido (HANASHIRO et al., 1978; DOS-SANTOS, 2014). Uma vez que ambas a crotoxina e a Cdca-II-PLA₂ possuem atividade fosfolipásica, posteriormente, foi utilizada uma cromatografia em Resource S

na presença de 6M de ureia (RANGEL-SANTOS et al., 2004), visando a separação das subunidades da crotoxina e das fosfolipases ácida e básica. A fração não retida contendo a Cdca-II-PLA₂ foi obtida após cromatografia de fase reversa, representando aproximadamente 3% do conteúdo total da peçonha. A Cdca-II-PLA₂ apresentou três vezes mais atividade sobre NOB do que Cdca-I-PLA₂, e também maior atividade fosfolipásica quando comparada à PLA₂s purificadas de *C. d. colilineatus* (PONCE-SOTO et al., 2002) e de *Porthidium hyoprora* (MARQUES et al., 2015).

Os métodos cromatográficos utilizados nesse estudo também tem sido empregados com sucesso na purificação de outras PLA₂ de peçonha de serpentes Viperidae (FERNANDÉZ et al., 2010; CORREA et al., 2016). A baixa concentração de Cdca-I-PLA₂ e o fato de que Cdca-II-PLA₂ eluir inicialmente com a crotoxina podem justificar o fato de que até o momento essas toxinas não haviam sido isoladas.

A pureza de ambas PLA₂s foi confirmada por espectrometria de massa e SDS-PAGE. A Cdca-I-PLA₂ apresentou apenas a forma de monômero, com uma massa molecular de 14.246 Da, em similaridade com outras PLA₂s ácidas caracterizadas da peçonha de serpentes da família Viperidae (FERREIRA et al., 2013; JIMENEZ-CHARRIS et al., 2016; RESENDE et al., 2017). Em contrapartida, a Cdca-II-PLA₂ como monômero possui massa de 14.418 Da, mas também apresentou dímeros e trímeros, detectados por espectrometria de massa, indicando um processo de oligomerização destas moléculas. Este fenômeno pode proporcionar um efeito conhecido como cooperatividade, que é característico de enzimas alostéricas, e pode ser observado em algumas PLA₂ crotálicas (BEGHINI et al., 2000; PONCE-SOTO et al., 2002; DENEGRI et al., 2010). O processo de dimerização de PLA₂ pode ampliar a capacidade de ligação das mesmas ao substrato, através do aumento da hidrofobicidade na ligação dos canais de cálcio, resultando assim na intensificação de sua atividade enzimática (SUN et al., 2009).

Ambas PLA₂ purificadas neste trabalho obedeceram a cinética de Michaelis-Mentem, onde a taxa de catálise progride com o aumento da concentração de substrato, e a síntese do produto é proporcional à reação da enzima. Ao longo da reação, todas as moléculas da enzima são saturadas com o substrato e a aceleração diminui (TOYAMA et al., 2014; RESENDE et al., 2017). Embora a Cdca-II-PLA₂ tenha apresentado maior atividade

fosfolipásica específica, a Cdca-I-PLA₂ apresentou maior afinidade pelo substrato, uma vez que apresentou um menor valor de K_m (NELSON & COX, 2014).

Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂ apresentaram comportamento semelhante em relação ao efeito da temperatura de incubação das mesmas na atividade fosfolipásica, sendo ambas termorresistentes. Essa característica também foi observada em outras PLA₂s, descritas como enzimas altamente estáveis devido à presença de até sete pontes dissulfeto em sua estrutura (TEIXEIRA et al., 2011; DENEGRI et al., 2010; FERREIRA et al., 2013).

Com relação ao pH, a Cdca-I-PLA₂ e a Cdca-II-PLA₂ apresentaram comportamento similar, sendo sensíveis a pHs mais ácidos, semelhante à outras PLA₂ purificadas da peçonha de serpentes (BREITHAUPT, 1976; TEIXEIRA et al., 2011; RESENDE et al., 2017). No entanto, as PLA₂ purificadas nesse trabalho apresentaram maior atividade enzimática proporcionalmente ao aumento do pH do ensaio tendo, portanto, maior atividade em pHs mais básicos. Esse comportamento não é observado em outras PLA₂, visto que essas normalmente possuem maior atividade em pH 8, sendo reduzida conforme o pH do meio aumenta (PONCE-SOTO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2011; MARQUES et al., 2015; RESENDE et al., 2017).

Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂ apresentaram alta similaridade com outras PLA₂ ácidas da peçonha de serpentes da família Viperidae (COGO et al., 2006; DENEGRI et al., 2010; FERREIRA et al., 2013). Cdca-II-PLA₂ também apresentou similaridade com a molécula precursora da crotapotina de *Crotalus durissus terrificus* e de proteínas similares encontradas em outras duas espécies de cascavel. Essa molécula foi primeiramente identificada por Bouchier e colaboradores (1991) como uma PLA₂ responsável por constituir, através de clivagens pós transducionais, as três cadeias polipeptídicas da subunidade ácida da crototoxina, a crotapotina (CA) (BOUCHIER et al., 1991; FAURE et al., 1991; FAURE et al., 2011). A PLA₂ precursora da crotapotina é também conhecida como pró-CA, e mantém todos os aminoácidos responsáveis pela ligação ao substrato e pelo mecanismo catalítico presente nas PLA₂s (BOUCHIER et al., 1991; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2008). Estes resultados, provavelmente, se devem ao fato de que a espécie *Crotalus durissus* compartilha a mesma origem filogenética da população da América do Norte (WÜSTER et al., 2005), possuindo então semelhança na

codificação genética com essas proteínas. Por outro lado, ambas PLA₂ purificadas nesse estudo não apresentaram muita similaridade com a única PLA₂ ácida identificada por clonagem na glândula de peçonha da subespécie *C.d.cascavella* (GUARNIERI et al., 2009), nem com outras PLAs₂ ácidas de cascavéis.

Várias PLA₂s da peçonha de serpentes são conhecidas por apresentarem atividade hemolítica, ou seja, induzem a lise da membrana de hemácias, embora possam não apresentar atividade hemolítica direta (SOARES et al., 2001; KETELHUT et al., 2003; DENEGRI et al., 2010; FERREIRA et al., 2010). No entanto, até o momento não se conhecia nenhuma PLA₂ purificada da peçonha de serpente com atividade hemaglutinante. A Cdca-I-PLA₂ foi capaz de aglutinar hemácias, o que sugere que a mesma seja uma quimolectina (PEUMANS & VAN DAMME et al., 1998), uma vez que possui pelo menos um sítio de ligação para carboidratos, além de um domínio com ação enzimática (CORDARA et al., 2011). Algumas proteínas já purificadas e classificadas como quimolectinas incluem as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) (BARBIERI et al., 1993), quitinases da classe I (COLLINGE et al., 1993) e aglutininas de um fungo da espécie *Marasmius oreades* (MOA) (CORDARA et al., 2011). Estudos futuros usando diferentes carboidratos e glicoproteínas como inibidores serão utilizados para determinar a importância do domínio lectínico nas atividades da Cdca-I-PLA₂ observadas sobre a hemostasia. Considerando que muitos receptores plaquetários e fatores da coagulação são glicoproteínas (CASTRO et al., 2006), é possível que o domínio lectínico esteja envolvido na ligação à essas proteínas.

As PLA₂s agem na hemostasia tanto sobre a agregação plaquetária, quanto sobre a coagulação sanguínea (FULY et al., 2004; KINI, 2006). Com relação à agregação, as PLA₂ podem ser classificadas em três grupos, baseados na forma como essas enzimas interferem na função das plaquetas (ANDREWS & BERNDT, 2000). O grupo I é representado pelas PLA₂ capazes de induzir a agregação plaquetária, o grupo II é constituído por PLA₂ que inibem a agregação das plaquetas induzida por diferentes agonistas, e o grupo III é formado por PLA₂s que apresentam um efeito bifásico, isto é, que em determinadas concentrações são agregantes e em outras atuam como inibidores (KINI & EVANS, 1990; SAJEVIC et al., 2011). Ambas PLA₂s purificadas neste trabalho fazem parte do grupo II, uma vez que inibiram a agregação induzida por adrenalina, ácido

araquidônico e colágeno, apesar de não terem atuado na agregação induzida por ADP. Várias PLA₂s purificadas de peçonhas de serpentes também são classificadas no mesmo grupo, como BE-I-PLA₂ (*Bothrops erythromelas*) (ALBUQUERQUE-MODESTO et al., 2006) que atua de forma semelhante às PLAs isoladas nesse estudo, BmooTX-I (*Bothrops moojeni*) (SANTOS-FILHO et al., 2008), CC-PLA₂-1 e CC-PLA₂-2 (*Cerastes cerastes*) (ZOUARI-KESSENTINI et al., 2009) e Bp-PLA₂ (*B. pauloensis*) (RODRIGUES et al., 2007).

Cdca-I-PLA₂ atuou como agonista em plaquetas lavadas, além de ter inibido a agregação induzida por trombina no mesmo sistema. Estes resultados sugerem que a Cdca-I-PLA₂ compete com a trombina pelos seus receptores plaquetários específicos, ocupando-os e impedindo que a trombina induza a agregação das plaquetas. Este comportamento inibitório foi evidenciado pelo ensaio onde a Cdca-I-PLA₂, tanto previamente incubada com as plaquetas antes da adição de trombina quanto pré-incubada com a trombina, reduziu significativamente a agregação das plaquetas lavadas. Além de uma possível ação direta sobre os receptores plaquetários para trombina, um outro possível mecanismo de ação da Cdca-I-PLA₂ seria a sua ligação à trombina, impedindo-a de ligar-se aos seus receptores plaquetários. A agregação em plaquetas lavadas induzida pela Cdca-I-PLA₂ também pode ter resultado de sua fração lectínica, uma vez que os receptores plaquetários são glicoproteínas com diferentes níveis de glicosilação (LAKHTIN, 1995; RAMASAMY, 2004; BERGER et al., 2014). As lectinas podem interagir com os receptores plaquetários, podendo induzir a agregação e a secreção dos grânulos das plaquetas, além de induzirem a ativação de um sistema de segundos mensageiros, ou também podem agir aglutinando as membranas das plaquetas (GREENBERG & JAMIESON, 1984; TORTI et al., 1995; SAMAL et al., 1998; SMINORVA & KHASPEKOVA, 1998; CLEMETSON, 2012). Um dos maiores receptores das plaquetas, GpIb, é a proteína mais glicosilada da membrana plaquetária, sendo 50 % da sua massa molecular constituída por carboidratos, e o complexo formado por esta glicoproteína (GpIb-IX-V) é o receptor do Fator von Willebrand (FvW), além de conter um sítio para a trombina (LAKHTIN, 1995; REZENDE-NETO, 2003). As lectinas também podem ter efeito inibitório na iniciação da adesão e agregação plaquetária pelo colágeno, ADP e trombina (KARPATKIN & KARPATKIN, 1974; RALPH & LAWRENCE, 1982).

A diferença na forma como essas enzimas atuam mostra que as mesmas podem agir em diferentes receptores plaquetários, por meio de diversos sítios farmacológicos presentes em sua estrutura (KINI, 2003). A atividade das PLA₂ isoladas de peçonhas sobre a agregação plaquetária ainda não é bem compreendida. A inibição da agregação pode ocorrer de maneira independente da atividade catalítica da enzima, sugerindo então que existe um sítio funcional separado do sítio catalítico, onde ocorre a inibição, ou através da região C-terminal dessas proteínas (SAJEVIC et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2011). Por outro lado, o mecanismo de ação mais comum das PLA₂ da peçonha de serpentes na inibição da agregação plaquetária é através dos cofatores do plasma, principalmente por meio dos fatores lipoprotéicos (HDL e LDL) (YUAN et al., 1995).

As PLA₂s hidrolisam essas lipoproteínas liberando lisofosfatidilcolina (LPC), que por sua vez, é capaz de inibir a mudança conformacional das plaquetas, a síntese de tromboxano A₂, além de inibir a agregação plaquetária induzida por diversos agonistas (YUAN et al., 1995; HUANG et al., 1997). Algumas PLA₂s também interferem na agregação plaquetária através da clivagem de fosfolipídios da membrana das plaquetas, liberando ácido araquidônico e seus metabólitos, como a prostaciclina, que atuam na inibição da agregação plaquetária, e o tromboxano, que atuam na ativação da agregação (FULY et al., 2004). Outras PLA₂s ácidas interagem com a membrana das plaquetas, induzindo um aumento da concentração de AMPc, além da disruptura do citoesqueleto das plaquetas, inibindo a agregação plaquetaria induzida por vários agonistas (HUANG et al., 1984). Outros estudos deverão ser realizados para determinar o mecanismo de ação das PLA₂s isoladas nesse estudo.

Além de atuarem na agregação plaquetária, as PLA₂s também podem ter ações sobre a coagulação, sendo classificadas em três classes: as fortemente anticoagulantes que inibem a coagulação sanguínea em concentrações menores que 2 µg/ml, as fracamente anticoagulantes que induzem a inibição da coagulação em concentrações entre 3 e 10 µg/ml e aquelas que são pró coagulantes (BOFFA & BOFFA, 1976; KINI, 2006). Ambas PLA₂s purificadas neste estudo são classificadas como fracamente anticoagulantes, pois a menor concentração capaz de induzir inibição da coagulação foi 142,5 µg/ml para Cdca-II-PLA₂ e 72,1 µg/ml e 288 µg/ml para Cdca-II-PLA₂, considerando os resultados do TTPA e o TP, respectivamente. Apesar de pertencerem a mesma classe, essas enzimas

apresentam diferenças na sua ação anticoagulante quando comparadas entre si, sendo a Cdca-I-PLA₂ mais anticoagulante do que a Cdca-II-PLA₂.

As PLA₂s da peçonha de serpentes são conhecidas por induzir efeitos anticoagulantes através da interação com os complexos de coagulação (complexo tenase extrínseco e intrínseco e/ou complexo protrombinase), através da hidrólise de fosfolipídeos de membrana ou por ligação proteína-proteína (MOUNIER et al., 2001; KINI, 2005). A região responsável pela atividade anticoagulante das PLA₂s pode incluir o sítio catalítico, a superfície de ligação interfacial que é formada por resíduos positivamente carregados, o C-terminal e o segmento localizado entre os resíduos 53 e 77 da sequência da aminoácidos (KINI, 2005). Nas PLA₂s mais potentes alguns resíduos entre a região 53 e 77 contém aminoácidos positivamente carregados, que quando substituídos tornam as PLA₂s fracamente anticoagulantes, especialmente se esses resíduos forem carregados negativamente, podendo também ser substituídos por resíduos neutros (KINI, 2005; KINI, 2006). Quando analisamos as sequências obtidas, Cdca-II-PLA₂ apresentou um resíduo de glutamato, que é negativamente carregado, na posição 77, enquanto a Cdca-I-PLA₂ apresentou um resíduo de glicina (apolar) na mesma posição, o que justifica a atividade coagulante observada.

As PLA₂s fracamente anticoagulantes atuam na via extrínseca, inibindo a ativação do fator X em Xa pelo complexo tenase extrínseco (KINI, 2005), ou atuando de forma enzimática através da degradação dos fosfolipídeos importantes para a formação do complexo tenase (MOUNIER et al., 2001). O aumento expressivo do TP, pequeno aumento do TTPa e ausência de alteração no TT sugere que a Cdca-I-PLA₂ inibe a coagulação sanguínea através de uma ação no complexo tenase extrínseco. Três fosfolipases A₂, denominadas CM-I, CM-II e CM-IV, purificadas da peçonha de *Naja nigricollis*, apresentaram comportamento semelhante (STEFANSSON et al., 1990; KINI, 2005). O discreto aumento do TP em relação ao TTPa, a intensa atividade fosfolipásica e o significante aumento do TT induzido pela Cdca-II-PLA₂ sugerem que a mesma tenha ação sobre o complexo tenase extrínseco, bem como na via comum da coagulação. Dabixin P, uma PLA₂ purificada da peçonha de *Daboia russelii* (SHARMA et al., 2016), tem ação sobre as mesmas vias de forma semelhante à Cdca-II-PLA₂.

Muitas enzimas da peçonha de serpentes são conhecidas por apresentarem atividade trombina-símile (MOUNIER et al., 2001), no entanto, até o momento apenas uma PLA₂ de peçonha de serpente é conhecida por apresentar essa ação. Denominada Gln49-PLA₂, esta enzima foi purificada da peçonha de *Gloydius ussuriensis* (ZHANG et al., 2007). As enzimas classificadas como trombina símile desencadeiam a coagulação de fibrinogênio e liberação de fibrinopeptídeos A e/ou B, porém, diferentemente da trombina, estas enzimas não podem ativar o factor XIII (factor de estabilização da fibrina), formando coágulos anormais de fibrina (MARSH & WILLIAMS, 2005).

Nossos resultados mostraram que a Cdca-II-PLA₂ foi capaz de degradar o substrato de trombina, sugerindo que esta enzima pode ter uma atividade trombina-símile. Entretanto, ao contrário da sua rápida ação anticoagulante, medida em segundos, a degradação do substrato de trombina pela Cdca-II-PLA₂ só teve início 10 minutos após a incubação enzima-substrato, sugerindo uma ação pro-coagulante tardia. Em estudo paralelo recente, Castro Melo (2016) demonstrou que a Cdca-II-PLA₂ apresenta baixa atividade específica (1,82 U/mg) e baixa afinidade ($K_m = 26,55$ mM) ao substrato de trombina, além da mesma não ter sido capaz de coagular o fibrinogênio até 300 segundos de incubação. Ainda segundo Castro Melo (2016), a Cdca-II-PLA₂ não foi capaz de degradar as cadeias α , β e γ do fibrinogênio até 20 minutos de incubação, indicando que a ação anticoagulante desta enzima não seria resultante de uma ação fibrinogenolítica. Por outro lado, esta enzima foi capaz de formar complexos com o fibrinogênio já nos primeiros segundos de incubação evidenciados em gel de eletroforese, sugerindo que a ação anticoagulante da Cdca-II-PLA₂ é resultante, ao menos em parte, da inibição da conversão do fibrinogênio em fibrina, pela trombina.

Até o momento, há poucos estudos envolvendo PLA₂ ácidas da peçonha de serpentes da família Viperidae. Neste trabalho, duas novas PLA₂ ácidas foram purificadas da peçonha de *Crotalus durissus cascavella*, tendo sido as mesmas caracterizadas quanto a sua estrutura e efeitos biológicos. Outros ensaios são requeridos para uma melhor compreensão do mecanismo de ação dessas PLA₂s.

3.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho duas fosfolipases A₂ ácidas, denominadas Cdca-I-PLA₂ e Cdca-II-PLA₂, foram purificadas da peçonha de *Crotalus durissus cascavella*. Ambas enzimas são as primeiras PLA₂ ácidas purificadas e caracterizadas da peçonha da espécie *Crotalus durissus*.

Cdca-I-PLA₂ possui peso molecular de 14.246 Da e atividade fosfolipásica de $11,51 \pm 0,5$ U/mg sendo considerada termorresistente e ácido sensível, apresentando maior atividade proporcionalmente ao aumento do pH. Sua sequência de aminoácidos possui homologia com outras PLA₂ ácidas de cascavéis. Possui atividade antiagregante plaquetária induzida por colágeno, ácido araquidônico e adrenalina, além de ser agregante plaquetária em plaquetas lavadas e inibidora da agregação de plaquetas lavadas através da ação sobre o receptor de trombina. Essa PLA₂ é anticoagulante agindo no complexo tenase extrínseco e/ou complexo protrombinase. Pode ser considerada a primeira PLA₂ da peçonha de serpente classificada como uma quimerolectina.

Cdca-II-PLA₂ apresenta peso molecular de 14.418 Da e atividade fosfolipásica específica de $26,75 \pm 0,15$ U/mg, sendo mais ativa do que a primeira. Também é considerada termorresistente e ácido sensível, com maior atividade proporcionalmente ao aumento do pH. Sua sequência de aminoácidos indica que essa PLA₂ é a molécula precursora da crotapotina. Possui atividade antiagregante plaquetária em PRP induzida por colágeno, ácido araquidônico e adrenalina. É capaz de inibir a coagulação sanguínea através do complexo tenase extrínseco e por meio da ação sobre o fibrinogênio. A Cdca-II-PLA₂ é a primeira PLA₂ purificada da peçonha de serpente classificada como inibidora de trombina, formando complexo com o fibrinogênio e degradando-o de forma muito lenta.

Portanto, Cdca-I-PLA₂ pode ser classificada, possivelmente, como uma quimerolectina anticoagulante com importante atividade sobre agregação plaquetária, enquanto Cdca-II-PLA₂ é uma fosfolipase com alta atividade enzimática, inibindo tanto a agregação plaquetária quanto a coagulação atuando, provavelmente, como um inibidor de trombina.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, R. D.; ZACHARSKI, L. R.; WIDIRSTKY, S.T.; ROSENSTEIN, R.; ZAITLIN, L. M.; BURGESS, D. R. Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 83, n. 1, p. 126-142, 1979.
- ALMEIDA, J.R.; RESENDE, L.M.; SILVA, A.G.; RIBEIRO, R.I.M.A.; STÁBELI, R.G.; SOARES, A.M.; CALDERON, L.A.; MARANGONI, S.; DA SILVA, S.L. CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A₂ from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. **Toxicon**, v. 120, p. 147-158, 2016.
- ALVES DA SILVA, J.; OLIVEIRA, K. C.; CAMILLO, M. A. P. Gyroxin increases blood-brain barrier permeability to Evans blue dye in mice. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 162-167, 2011.
- ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 114, n. 5, p. 447-453, 2004.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v. 38, n. 6, p. 775–791, 2000.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.; FULY, A.L.; CORREA, F.M.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of a acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 64, p. 723-732, 2002.
- ARAÚJO, R.C.C. **Isolamento e caracterização funcional de uma fosfolipase A2 de *Bothrops jararaca*: Avaliação do potencial antitumoral e inflamatório.** Dissertação (Mestrado em Toxicologia) - Universidade de São Paulo – USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2014.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂ – a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-841, 1996.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, S.E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 480-489, 2003.
- BAKKEN, G. S.; KROCHMAL, A. R. The imaging properties and sensitivity of the facial pit of pitvipers as determined by optical and heat-transfer analysis. **J. Exp. Biol.**, v. 210, p. 2801–2810, 2007.
- BANNO, A.; GINSBERG, M.H. Integrin activation. **Biochem Soc Trans**, v. 36, p. 229, 2008.

- BAO, Y.; BU, P.; JIN, L.; HONGXIA, W.; YANG, Q.; AN, L. Purification, characterization and gene cloning of a novel phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 37, p. 558–565, 2005.
- BARBIERI, L.; BATTELLI, M.G.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. Reviews on Biomembranes, v. 1154, n. 3-4, p. 237-282, 1993.
- BEGHINI, D.G.; TOYAMA, M.H.; HYSLOP, S.; SODEK, L.C.; NOVELLO; MARANGONI, S. Enzymatic characterization of a new phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracambóia) venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 19, n. 8, 2000.
- BERGER, M.; DA SILVA, W.O.B.; SANTI, L.; GUIMARÃES, J.A. Hemostasia: uma breve revisão. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 140-148, ISSN 1983-0882, 2014.
- BOFFA, M. C.; BOFFA, G. A. A phospholipase A₂ with anticoagulant activity. Inhibition of the phospholipid activity in coagulation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 429, p. 839–852, 1976.
- BOLDRINI-FRANÇA, J. **Transcriptoma da glândula de peçonha de Crotalus durissus collilineatus**: análise do perfil de expressão gênica. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2008.
- BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M.M.S.; RODRIGUES, R.S.; DE LA TORRE, P.; PÉREZ, A.; SOARES, A.M.; ZINGALI, R.B.; NOGUEIRA, R.A.; RODRIGUES, V.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of Proteomic**, v. 73, p. 1758-1776, 2010.
- BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crototoxin and its isolated subunits. **Eur. J. Biochem**, v. 99, p. 471-482, 1979.
- BOUCHIER, C.; BOULAIN, J-C.; BON, C.; MÉNEZ, A. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crototoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1088, p. 401-408, 1991.
- BRASS, L. Understanding and evaluating platelet function. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, v. 2010, n. 1, p. 387-396, 2010.
- BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A₂ and the crototoxin complex. **Toxicon**, v. 14, p. 221-233, 1976.

BSH, Lista de espécies de répteis do Brasil. **Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH)**. Disponível em: <http://www.sbsherpetologia.org.br/>, 2014. Acesso em: 20 nov. 2016.

BULLOCK, T. H.; COWLES, R. B. Physiology of an infrared receptor: the facial pit of pit vipers. **Science**, v. 115, p. 541–543, 1952.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 23, n. 1, p. 49-59, 2008.

CALVETE, J.J.; FASOLI, E.; SANZ, L.; BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.G. Exploring the venom proteome of the Western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomics and combinatorial peptide ligand library approaches. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 3055–3067, 2009.

CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **J. Mass Spectrom.**, v. 42, p. 1405–1414, 2007.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; CID, P.; DE LA TORRE, P.; FLORES-DÍAZ, M.; DOS SANTOS, M.C.; et al. Snake venomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **J. Proteome Res.**, v. 9, p. 528–44, 2010.

CASTILLO, J.; VARGAS, L.; SEGURA, C.; GUTIÉRREZ, J.; PEREZ, J. In vitro antiplasmoidal activity of phospholipases A₂ and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxins**, v. 4, p. 1500, 2012.

CASTOE, T.A.; DAZA, J.M.; SMITH, E.N.; SASA, M.; KUCH, U.; CAMPBELL, J. A.; CHIPPINDALE, P.T.; PARKINSON, C.L. Comparative phylogeography of pitvipers suggests a consensus of ancient Middle American highland biogeography. **J. Biogeogr.**, v. 36, p. 88–103, 2009.

CASTRO, H.C.; FERREIRA, B.L.A., NAGASHIMA, T., SCHUELER, A., RUEFF, C., CAMISASCA, D., FILGUEIRA, M. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n.5, p. 321-32, 2006.

CASTRO-MELO, M.P.L. **Ação da Cdca-II-PLA₂, uma fosfolipase A₂ anticoagulante isolada da peçonha de *Crotalus durissus cascavella*, sobre o fibrinogênio.** Monografia – Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

CLEMETSON K.J. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. **Toxicon**, v. 56, p. 1236–46, 2012.

CLEMETSON, K. J. Platelet GPIb-V-IX complex. **Thrombosis and haemostasis**, v. 78, n. 1, p. 266, 1997.

COGO, J.C.; LILLA, S.; SOUZA, G.H.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v. 88, n. 12, p. 1947-1959, 2006.

COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 31-40, 1993.

COMINETTI, M.R. Caracterização da atividade proteolítica de toxinas e uso de inibidores, In: SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; SOUZA, D.H.F. **Métodos em Toxinologia:** toxinas de serpentes. Ed. EdUFSCar. São Carlos, p 45- 51, 2007.

CORDARA, G.; EGGE-JACOBSEN, W.; JOHANSEN, H.T.; WINTER, H.C.; GOLDSTEIN, I.J.; SANDVIG, K.; KRENGEL, U. *Marasmius oreades agglutinin* (MOA) is a chimerolectin with proteolytic activity. **Bioc. and Biophys. Res. Comm.**, v. 408, n. 3, p. 405-410, 2011.

CORRÊA, E.A.; KAYANO, A.M.; DINIZ-SOUSA, R.; SETÚBAL, S.S.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J.P.; DA SILVA, S.L. Isolation, structural and functional characterization of a new Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi urutu* with bactericidal potential. **Toxicon**, v. 115, p. 13-21, 2016.

CORREIA, M.T.; COELHO, L.C. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 261-273, 1995.

COSTA, H.C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: Mudanças taxonômicas. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>, 2014. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Acesso em 10 de janeiro de 2017.

CUNHA, E.M.; MARTINS, O.A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* uma revisão. **Revista eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. 2, p. 21- 26, 2012.

DA SILVA, A.M.; BERNARDE, P.S.; DE ABREU, L.C. Acidentes com animais peçonhentos no Brasil por sexo e idade. **Journal of Human Growth and Development**, v. 25, n. 1, p. 54-62, 2015.

DAVIE, E.W.; RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, n. 3638, p. 1310-1312, 1964.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J.C.; SPENCER, P.J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R.C.; OLIVA, M.L.V.; DA SILVA, M.B.; GUARNIERI, M.C. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 3, p. 377-384, 2006.

DE PAULA, R.C.; CASTRO, H.C.; RODRIGUES, C.R.; MELO, P.A.; FULY, A.L. Structural and pharmacological features of phospholipases A₂ from snake venoms. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 899-907, 2009.

DENEGRI, M.G.; ACOSTA, O.C.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; MARTINS-DESOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, G.; LEIVA, L.; PONCE-SOTO, L. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, v. 56, p. 64–74, 2010.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.

DENNIS, E.A.; CAO, J.; HSU, Y.H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A₂ enzymes: Physical structure, Biological function, Disease implication, Chemical inhibition, and Therapeutic intervention. **Chem. Rev.**, v. 111, n. 10, p. 6130-85, 2011.

DOS-SANTOS, M.C. Crotoxina e crotoxina-símile isoladas de venenos de subespécies de *Crotalus durissus* e suas múltiplas atividades biológicas. **Scientia Amazonia**, v. 3, n. 1, p. 102-115, 2014.

ERHARDTSEN, E. To general haemostasis: the evidence-based route. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.**, v. 32, n. 1, p. 47-52, 2002.

FAURE, G.; GUILLAUME, J. L.; CAMOIN, L.; SALIOU, B.; BON, C. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry**, v. 30, n. 32, p. 8074-8083, 1991.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β-neurotoxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 412, n. 2, p. 176-191, 2011.

FERNANDÉZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M.; NA, Y.; SANZ, L.; JUARÉZ, P.; CALVETE, J.J.; LOMONTE, B. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. **Biochimie**, v. 92, p. 273-283, 2010.

FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.O.; DUSSE, L.M.S.; CARVALHO, M.G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FILHO, A. A., CAMPOLINA, D., DIAS, M. B. Ofidismo. **Toxicologia Clínica**. Belo Horizonte. São Paulo, Folium Editora, 229-237, 2001.

FLAUMENHAFT, R. Molecular basis of platelet granule secretion. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 7, p. 1152-1160, 2003.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-985, 2005.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 229-237, 2001.

FULY, A.L.; DE MIRANDA, A.L.P.; ZINGALI, R.B.; GUIMARÃES, J.A. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, p. 1589–1597, 2002.

FULY, A.L.; SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J.R.; GUIMARÃES, J.A. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 86, n. 9–10, p. 731–739, 2004.

GAN, Z.R.; GOULD, R.J.; JACOBS, J.W.; FRIEDMAN, P.A.; POLOKOFF, M.A. Echistatin: A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 19827-32, 1988.

GATT, S. Purification and properties of phospholipase A₁ from rat and calf brain. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 159, p. 304-316, 1968.

GE HEALTHCARE. Ion exchange Chromatography and Cromatofocusing: Principles and Methods. **Handbooks from GE Healthcare**, 11-0004-21, 2010.

GEORGIEVA, D.; ÖHLER, M.; SEIFERT, J.; VON BERGEN, M.; ARNI, R.K.; GENOV, N.; BETZEL, C. Snake venomic of *Crotalus durissus terrificus* – Correlation with pharmacological activities. **Jounal of proteome research**, v. 9, p. 2302-2316, 2010.

GIMENES, S.N.C.; FERREIRA, F.B.; SILVEIRA, A.C.P.; RODRIGUES, R.S.; YONEYAMA, K.A.G.; DOS SANTOS, J.I.; FONTES, M.R.M.; BRITES, V.L.C.; SANTOS, A.L.Q.; BORGES, M.H.; LOPES, D.S.; RODRIGUES, V.M. Isolation and biochemical characterization of a g-type phospholipase A₂ inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **Toxicon**, v. 81, p. 58–66, 2014.

GREENBERG, J.H.; JAMIESON, G.A. The effects of various lectins on platelet aggregation and release. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 345, n. 2, p. 231-242, 1974.

GUARNIERI, M.C.; MELO, E.S.L.; MELO, K.M.S.; ALBUQUERQUE-MODESTO, J.C.; PRIETO-DA-SILVA, A.R.B.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Cloning of a novel acidic phospholipase A₂ from the venom gland of *Crotalus durissus cascavella* (Brazilian northeastern rattlesnake). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. 745-761, 2009.

GUTIÉRREZ, J.M. Snakebite envenomation in Central America. Em: MACKESSY, S.P. (Ed.), **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. CRC Press, Boca Raton, p. 491 e 507, 2009.

GUTIÉRREZ, J.M.; DOS SANTOS, M.C.; DE FATIMA FURTADO, M.; ROJAS, G. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. **Toxicon**, v. 29, n. 10, p. 1273-1277, 1991.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en America Latina - **ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL**: Biología, Clínica e Terapêutica dos Acidentes Ed. Sarvier, São Paulo, p. 310-323, 2003.

HANASHIRO, M.A.; DA SILVA, M.H.; BIER, O.G. Neutralization of crotoxin and crude venom by rabbit antiserum to *Crotalus* phospholipase A₂. **Immunochemistry**, v. 15, p. 745-750, 1978.

HARDEN, T.K.; SONDEK, J. Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 46, p. 355-79, 2006.

HEEMSKERK, J.W.; KUIJPERS, M.J.; MUNNIX, I.C.; SILJANDER, P.R. Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 15, n. 3, p. 86-92, 2005.

HEO, Y.; KWON, Y.C.; SHIN, K.; YOON, W.D.; HAN, C.H.; YUM, S.; KIM, E. cDNA and gene structures of two phospholipase A₂ isoforms, acidic PLA₂ and PLA₂ PA3/PA3B/PA5, in *Nemopilema nomurai* jellyfish venom. **Toxicon**, v. 122, p. 160-166, 2016.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 16, n. 1, p. 17-20, 2003.

HOFFMAN, M.; MONROE, D.M. A cell-based model of hemostasis. **Thrombosis and haemostasis-stuttgart**, v. 85, n. 6, p. 958-965, 2001.

HUANG, M.Z.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHUNG, M. C.; KINI, R.M. Complete Amino Acid Sequence of an Acidic, Cardiotoxic Phospholipase A₂ from the Venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra): A Novel Cobra Venom Enzyme with “Pancreatic Loop”. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 338, n. 2, p. 150-156, 1997.

ITIS (Fevereiro de 2017) from the Integrated Taxonomic Information System on-line database, <http://www.itis.gov>.

JAYANTHI, G.P.; GOWDA, T.V. Geographical variation in India in the composition and lethal potency of Russel's viper (*Vipera russelli*) venom. **Toxicon**, v. 26, p. 257-264, 1988.

JESPERSEN, J.; SIDELMAN, J. A study of the conditions and accuracy of the thrombin time assay of plasma fibrinogen. **Acta haemat.**, v. 67, p. 2-7, 1982.

JIMÉNEZ-CHARRIS, E.; MONTEALEGRE-SÁNCHEZ, L.; SOLANO-REDONDO, L.; CASTRO-HERRERA, F.; FIERRO-PÉREZ, L.; LOMONTE, B. Divergent functional profiles of acidic and basic phospholipases A₂ in the venom of the snake *Porthidium lansbergii lansbergii*. **Toxicon**, v. 119, p. 289-298, 2016.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev. Ass. Méd. Bras.**, v. 36, p. 66-77, 1990.

KARPATKIN, S.; KARPATKIN, M. Inhibition of the enzymatic activity of thrombin by concanavalin A. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 57, n. 4, p. 1111-1118, 1974.

KASIRER-FRIEDE, A.; COZZI, M.R.; MAZZUCATO, M.; DE MARCO, L.; RUGGERI, Z.M.; SHATTIL, S.J. Signaling through GP Ib-IX-V activates α IIb β 3 independently of other receptors. **Blood**, v. 103, n. 9, p. 3403-3411, 2004.

KETELHUT, D.F.J.; DE MELLO, M.H.; VERONESE, E.L.G.; ESMERALDINO, L.E.; MURAKAMI, M.T.; ARNI, R.K.; SAMPAIO, S.V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 85, n. 10, p. 983-991, 2003.

KINI, M.R. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006.

KINI, R. M. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, n. s1, p. 195-208, 2011.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

KINI, R.M. Phospholipase A₂—a complex multifunctional protein puzzle. Em: KINI, R.M., (Ed.), **Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Inglaterra, p. 1-28, 1997.

KINI, R.M.; DOLEY, R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. **Toxicon**, v. 56, p. 855-67, 2010.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A₂ isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Toxicon**, v. 33, p. 1585-1590, 1995.

KUDO, I. Diversity of Phospholipase A₂ Enzymes. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1157, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAKHTIN, V. M. Use of lectins in the analysis of carbohydrate moieties of glycoproteins and other natural glycoconjugates. **Biochemistry-Moscow**, v. 60, n. 2, p. 131-153, 1995.

LEUNG, MD. Hemostasis and its Regulation. **ACP Medicine**, 2012.

LIRA-DA-SILVA, R.M.; MISE, Y.F.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; ULLOA, J.; HAMDAM, B.; BRAZIL, T.K. Serpentes de importância médica no Nordeste do Brasil. **Gaz. méd.** Bahia, v. 79, supl.1, p. 7-20, 2009.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885-901, 2003.

LOMONTE, B.; GENÉ, J.; GUTIÉRREZ, J.; CERDAS, L. Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. **Toxicon**, v. 21, n. 3, p. 379-384, 1983.

LOSCALZO, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. **Circ Res.**, v. 88, n. 8, p. 756-762, 2001.

LU, Q.; NAVFAEV, A.; CLEMETSON, M.J.; CLEMETSON, K. J. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1089-1098, 2005.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, n. 4931, p. 498-499, 1964.

MAGRO, A.J.; MURAKAMI, M.T.; MARCUSSI, S.; SOARES, A.M.; ARNI, R.K.; FONTES, M.R. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric state. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 323, n. 1, p. 24-31, 2004.

MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.D.; OLIVEIRA, C.Z.; QUINTERO RUEDA, A.; MENALDO, D.L.; BELEBONI, R.O.; SOARES, A.M. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 8, p. 743-756, 2007.

MARLAS, G. Purification and preliminar structure of a potente platelet aggregation glycoprotein isolated from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Biochimie**, v. 67, n. 12, p. 1231-1239, 1982.

MARQUES, P.P.; ESTEVES, A.; LANCELLOTTI, M.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S. Novel acidic phospholipase A₂ from *Porthidium hyoprora* causes inflammation with mast cell rich infiltrate. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 1, p. 78-84, 2015.

MARSH N.; WILLIAMS V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1171–1181, 2005.

MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S. I.; LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69-72, 2005.

McCRANIE, J.R. *Crotalus durissus*, Linnaeus, Neotropical Rattlesnake. **Catalogue of American Amphibians and Reptiles**, 1993.

MENSCHIKOWSKI, M.; HAGELGANS, A.; SIEGERT, G. Secretory phospholipase A₂ of group IIA: Is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases? **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v. 79, n. 1, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS (2015) - **Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 1, p. 41-48, 2006.

MORA-OBANDO, D.; FERNANDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. **PloS one**, v. 9, n. 10, 2014.

MORITA, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1099-1114, 2005.

MOUNIER, C.M.; BON, C.; KINI, R.M. Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A₂: protein- versus phospholipid-dependent mechanism of action. **Haemostasis**, v. 31, p. 279-287, 2001.

MUKHERJEE, A.K. A major phospholipase A₂ from *Daboia russelii russelii* venom shows potent anticoagulant action via thrombin inhibition and binding with plasma phospholipids. **Biochimie**, v. 99, p. 153-161, 2014.

NACHMAN, R.L.; LEUNG, L.L.; KLOCZEWSIAK, M.; HAWIGER, J. Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with the fibrinogen D domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 13, p. 8584-8588, 1984.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principios de Bioquímica**: Lehninger. Omega, 2014.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 363-370, 2005.

OLIVEIRA, C.Z.; MENALDO, D.L.; MARCUSSI, S.; SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M. An

alpha-type phospholipase A₂ inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: structural and functional characterization. **Biochimie**, v. 90, p. 1506–1514, 2008.

OSIPOV, A.V.; FILKIN, S.Y.; MAKAROVA, Y.V.; TSETLIN, V.I.; UTKIN, Y.N. A new type of thrombin inhibitor, noncytotoxic phospholipase A₂, from the *Naja haje* cobra venom. **Toxicon**, v. 55, p. 186–194, 2010.

PATSCHEKE, H.; BROSSMER, R.; WÖRNER, P. D-galactose-binding lectins induce a differential response of blood platelets. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 75, n. 1, p. 200-206, 1977.

PEIGNEUR, S.; ORTS, D.J.; DA SILVA, A.R.P.; OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; DE OLIVEIRA, E.B.; TYTGAT, J. Crotamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels. **Molecular pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 90-96, 2012.

PÉREZ-GÓMEZ, F.; BOVER, R. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombos y hemorragia. **Rev. Esp. Cardiol.**, v. 60, n. 12, p. 1217-1219, 2007.

PEUMANS, W.J.; ROY, S.; BARRE, A.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F.; VAN DAMME, E.J. Elderberry (*Sambucus nigra*) contains truncated Neu5Ac (α-2, 6) Gal/GalNAc-binding type 2 ribosome-inactivating proteins. **FEBS letters**, v. 425, n. 1, p. 35-39, 1998.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

PONCE-SOTO, L.A.; TOYAMA, M.H.; HYSLOP, S.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **J. Protein Chem.**, v. 21, p. 131-136, 2002.

POUGH, F.H. **Encyclopedia of Biodiversity – Biodiversity of Reptiles**. Segunda Edição. Waltham, MA: Academic Press, 2013. 400-413 p.

PYRON, A.R.; BURBRINK, F.T.; WIENS, J.J. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **BMC Evolutionary Biology**, v.13, p. 3-53, 2013.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; MORENO, F.B.M.B.; NOGUEIRA, L.D.L.; MARTINS, A.M.; TOYAMA, D.D.O.; TOYAMA, M.H.; YAMANE, T. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 44, n. 3, p. 412-423, 2006.

RAMASAMY, I. Inherited bleeding disorders: disorders of platelet adhesion and aggregation. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 49, n. 1, p. 1-35, 2004.

RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E.C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CARDOSO, D.F.; MOTA, I. A comparative study of biological activities of crototoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 801-810, 2004.

REBECHI, M.J.; PENTYALA S.N. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. **Physiological reviews**, v. 80, n. 4, p. 1291-335, 2000.

RESENDE, L.M.; ALMEIDA, J.R.; RAMOS, R.S.; COLLAÇO, R.C.O.; SIMIONI, L.R.; RAMÍREZ, D.; GONZÁLEZ, W.; SOARES, A.M.; CALDERON, L.A.; MARANGONI, S.; DA SILVA, S.L. Exploring and understanding the functional role, and biochemical and structural characteristics of an acidic phospholipase A₂, AplTx-I, purified from *Agkistrodon piscivorus leucostoma* snake venom. **Toxicon**, v. 127, p. 22-36, 2017.

REZENDE NETO, J. M. Avaliação da atividade agregante e antiagregante plaquetária de formas moleculares das lectinas de sementes de *Cratylia mollis* MART. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2003.

RIDDEL JR, J.P.; AOUIZERAT, B.E.; MIASKOWSKI, C.; LILLICRAP, D.P. Theories of blood coagulation. **J. Pediatr. Oncol. Nurs.**, v. 24, n. 3, p. 123-31, 2007.

ROBERTS, D.E.; MCNICOL, A.; BOSE, R. Mechanism of collagen activation in human platelets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19421-19430, 2004.

RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.; TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; FULY, A.L.; SOARESM, A.M.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 153–165, 2007.

ROMERO-VARGAS, F.F.; PONCE-SOTO, L.A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of two new PLA₂ isoforms Cdc-9 and Cdc-10 from *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 151, p. 66-74, 2010.

SAIKIA, D.; BORDOLOI, N.K.; CHATTOPADHYAY, P.; CHOKLINGAM, S.; GOSH, S.S.; MUKHERJEE, A.K. Differential mode of attack on membrane phospholipids by an acidic phospholipase A₂ (RVVA-PLA₂-I) from *Daboia russelli* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1818, p. 3149–3157, 2012.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627-645, 2011.

SALVINI, T.F.; AMARAL, A.C.; MYIABARA, E.H.; TURRI, J.A.O.; DANIELLA, P.M.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v. 39, p. 1141-1149, 2001.

SAMAL, A. B.; TIMOSHENKO, A. V.; LOIKO, E. N.; KALTNER, H.; GABIUS, H. J. Formation of lactose-resistant aggregates of human platelets induced by the mistletoe lectin and differential signaling responses to cell contact formation by the lectin or thrombin. **Biochemistry**, v. 63, n. 5, p. 516-522, 1998.

SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; GONÇALVES, L.R.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.F.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES, C.A.; SANO-MARTINS, I.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comp. Biochem. Physiol. Part C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 122, p. 61–73, 1999.

SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ARCE, V.; GUEVARA, C.; LÓPEZ, J. C.; CHAVES, E.; VELÁSQUEZ, R.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Geographic and ontogenetic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. **Rev. Biol. Trop.**, v. 50, p. 337–346, 2002.

SCHALOSKE, R.H., DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

SERRANO, S.M.; MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005.

SERRANO, S.M.T.; REICHL, A.P.; MENTELE, R.; AUERSWLD, E.A.; SANTORO, M.L.; SAMPAIO, C.A.M.; CAMARGO, A.C.M.; ASSAKURA, M.T. A novel Phospholipase A2, Bj-PLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 367, p. 26–32, 1999.

SERRANO, S.M.T.; SHANNON, J.D.; WANG, D.; CAMARGO, A.C.M.; FOX, J.W. A multifaceted analysis of Viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, p. 501–510, 2005.

SHARMA, M.; IYER, J.K.; SHIH, N.; MAJUMDER, M.; MATTAPARTHI, V.S.K.; MUKHOPADHYAY, R.; et al. Daboxin P, a major phospholipase A₂ enzyme from the Indian *Daboia russelii russelii* venom targets Factor X and Factor Xa for its anticoagulant activity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1-26, 2016.

SHI, Y.; ZHANG, P.; ZHANG, L.; OSMAN, H.; MOHLER, E.R.; MACPHEE, C.; WILENSKY, R.L. Role of lipoprotein-associated phospholipase A₂ in leukocyte activation and inflammatory responses. **Atherosclerosis**, v. 191, n. 1, p. 54-62, 2007.

SHILOAH, J.; KLIBANSKY, C.; DE VRIES, A.; BERGER, A. Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera palestinae* venom. **Journal of Lipid Research**, v. 14, n. 3, p. 267-278, 1973.

SILVA CUNHA, K.C. **Efeito da fosfolipase A₂ isolada do veneno da serpente *Lachesis muta* na sobrevida das células ganglionares da retina de ratos: vias de sinalização envolvidas.** Tese - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

SILVEIRA, L.B.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; SILVA JR., F.P.; MARCUSSIE, S.; FULY, A.L.; NOMIZOB, A.; DA SILVA, S.L.; STÁBELI, R.G.; ARANTESA, E.C.; SOARES, A.M. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 35–43, 2012.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A 2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 1, p. 1-19, 2000.

SMIRNOVA, I.V.; KHASPEKOVA, S.G.; IGNATOV, V.V.; MAZUROV, A.V. Interaction of wheat germ agglutinin and concanavalin A with platelets. Stimulation of platelet functional reactions and binding with membrane glycoproteins. **Biochemistry**, v. 63, n. 6, p. 710-718, 1998.

SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; CECCHINI, A.L.; ARANTES, E.C.; FRANÇA, S.C.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Effects of chemical modifications of crototoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crototoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 33, n. 9, p. 877-888, 2001.

SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R.G.; FRANÇA, S.C.; GIGLIO, J.R.; WARD, R.J.; ARANTES, E.C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 302, n. 2, p. 193-200, 2003.

SOERENSEN, B. Produção de soros anti peçonhetos e características imunológicas de cada soro. Anavenenos. Em: SOERENSEN, B. **Animais peçonhetos—reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros e tratamento dos envenenamentos.** Rio de Janeiro/São Paulo, Atheneu, 1990.

SOUSA, J.R.F.; MONTEIRO, R.Q.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B. Proteolytic action of Bothrops jararaca venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, p. 787-792, 2001.

SOUZA, D.H.F. Atividade L-aminoácido oxidase de venenos de serpentes. Em: SELISTREDE- ARAÚJO E SOUZA. **Métodos em Toxinologia:** toxinas de serpentes. EdUFSCar, São Carlos, Cap. 5, p. 57, 2007.

STEFANSSON, S.; KINI, R.M.; EVANS, H.J. The basic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymatic mechanism. **Biochemistry**, v. 29, n. 33, p. 7742–7746, 1990.

SUN, M.Z.; LIU, S.; YANG, F.; GREENAWAY, F.T.; XU, Y. A novel phospholipase A2 from *Akgistrodon blomhoffii ussurensis* venom: Purification, proteomic, functional and structural characterizations. **Biochimie**, v. 91, p. 558–567, 2009.

TEIXEIRA, S.S.; SILVEIRA, L.B.; DA SILVA, F.M.N.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SILVA JR, F.P.; IZIDORO, L.F.M.; FULY, A.L.; JULIANO, M.A.; DOS SANTOS, C.R.; MURAKAMI, M.T.; SAMPAIO, S.V.; DA SILVA, S.L.; SOARES, A.M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Arch. Toxicol.**, v. 85, p. 1219–1233, 2011.

TORTI, M.; RAMASCHI, G.; SINIGAGLIA, F.; BALDUINI, C. Dual mechanism of protein-tyrosine phosphorylation in concanavalin A-stimulated platelets. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 30-38, 1995.

TOYAMA, D.O.; FERREIRA, M.J.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; GAETA, H.H.; TOYAMA, M.H. Effect of chlorogenic acid (5-caffeoylequinic acid) isolated from Baccharis oxydonta on the structure and pharmacological activities of secretory phospholipase A₂ from *Crotalus durissus terrificus*. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.D.O.; PASSERO, L.F.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; TOMOKANE, T.Y.; MARTINS, M.A.C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 47-57, 2006.

TSAI, I.H.; TSAI, T.S.; WANG, Y.M.; TU, M.C.; CHANG, H.C. Cloning and characterization of *Trimeresurus gracilis* venom phospholipases A₂: Comparison with *Ovophis okinavensis* venom and the systematic implications. **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 151-157, 2012.

TSETLIN, V. Snake venom a-neurotoxins and other ‘three-finger’ proteins. **Eur. J. Biochem.**, v. 264, n. 2, p. 281-286, 1999.

UETZ, P.; JIRÍ HOŠEK. **The Reptile Database**. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em: 26 janeiro 2017.

ULBRICH-HOFMANN, R.; LERCHNER, A.; OBLOZINSKY, M.; BEZAKOVA, L. Phospholipase D and its application in biocatalysis. **Biotechnology letters**, v. 27, n. 8, p.. 535-544, 2005.

VALENTÍN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂. **Biochimie**, v. 82, p. 815-821, 2000.

VAN DEN BOSCH, H.; AARSMAN, A.J.; SLOTBOOM, A.J.; VAN DEENEN, L.L.M. On the specificitybof rat-liver lysophospholipase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 164, p. 215-225, 1968.

VANZOLINI, P.E.; HEYER, R.W. The American herpetofauna and the Interchange. In: **The Great American Biotic Interchange**, Eds Stehli FG, Webb SD, p. 475–487. Plenum Press, New York, 1985.

VANZOLINI, P.E.; RAMOS-COSTA, A.M.M.; VITT, L.J. **Répteis das Caatingas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p. 67–68, 1980.

VARGAS, L.J.; LODOÑO, M.; QUINTANA, J.C.; RUA, C.; SEGURA, C.; LOMONTE, B.; NÚÑEZ, V. An acidic phospholipase A₂ with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 161, p. 341-347, 2012.

VERRASTRO, T. **Hematologia e hemoterapia:** fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

VIJA, H.; SAMEL, M.; SIIGUR, E.; AASPOLLU, A.; TRUMMAL, K.; TONISMAGI, K.; SUBBI, J.; SIIGUR, J. Purification, characterization, and cDNA cloning of acidic platelet aggregation inhibiting phospholipases A₂ from the snake venom of *Vipera lebetina* (Levantine viper). **Toxicon**, v. 54, p. 429–439, 2009.

VINE, A.K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2009.

WEI, J.F.; WEI, X.L.; CHEN, Q.Y.; HUANG, T.; QIAO, L.Y.; WANG, W.Y.; et al. N49 phospholipase A₂, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A₂. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 3, p. 462-471, 2006.

WÜSTER, W.; FERGUSON, J.E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J.A.; POOK, C.E.; SALOMÃO, M.G.; THORPE, R.S. Tracing an invasion: landbridges, refugia and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Mol. Ecol.**, v. 14, p. 1095–108, 2005.

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M.G.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J.A.; THORPE, R.S. Origins and evolution of the South American pit viper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. Em: **Biology of the Vipers** (eds Schuett GW, Höggren M, Douglas ME, Greene HW), p. 111–128. Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, Utah, 2002.

YONAMINE, C.M.; PRIETO DA SILVA, A.R.B.; MAGALHÃES, G.S. Serine proteases — Cloning, Expression and Potential Applications. In: BAPTISTA, G.R. "An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications", ISBN 978-953-51-1151-1, 2013.

YUAN, Y.; JACKSON, S.P.; NEWNHAM, H.H.; MITCHELL, C.A.; SALEM, H.H. An essential role for lysophosphatidylcholine in the inhibition of platelet aggregation by secretory phospholipase A₂. **Blood**, v. 86, n. 11, p. 4166-4174, 1995.

ZOUARI-KESSENTINI, R.; LUIS, J.; KARRAY, A.; ZIRI-KALLECH, O.; SRAIRI-ABID, N.; BAZAA, A.; LORET, E.; BEZZINE, S.; AYEB, M.E.; MARRAKCHIM, N. Two purified and characterized phospholipases A₂ from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. **Toxicon**, v. 53, p. 444–453, 2009.